

**Protektive Effekte des Adiponektins und der Adiponektin-Paraloge  
*C1q/tumor necrosis factor- $\alpha$ -related protein (CTRP) 1-9* im Herz**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Benedikt Hermann Siegler  
aus Neustadt an der Weinstraße

Gießen 2015

Aus dem Physiologischen Institut  
(Direktor Prof. Dr. Rainer Schulz)

Betreuerin: Prof. Dr. Susanne Rohrbach

Gutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Tag der Disputation: 11.01.16

*meinen Eltern gewidmet*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1	Das metabolische Syndrom und kardiovaskuläre Erkrankungen.....	4
1.2	Die endo- und parakrine Funktion des Fettgewebes.....	4
1.3	Adiponektin: Struktur und Vorkommen .....	6
1.4	Modulation Adipositas-assoziiierter, kardiovaskulärer Pathologien durch Adiponektin.....	7
1.5	C1q/tumor necrosis factor- $\alpha$ -related proteins: Paralogue des Adiponektins ..	8
1.5.1	Struktur der Adiponektinparalogue .....	8
1.5.2	Biologische Funktionen von CTRP 1, 2, 7 und 9.....	9
1.6	Adiponektinrezeptoren und nachgeschaltete Signalwege.....	11
1.7	Reaktive Sauerstoffspezies und antioxidative Schutzmechanismen im Rahmen metabolischer und kardialer Pathologien.....	13
1.8	Fragestellung.....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1	Material .....	16
2.1.1	Geräte .....	16
2.1.2	Software.....	17
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	17
2.1.4	Chemikalien.....	18
2.1.5	Kit-Systeme .....	20
2.1.6	CTRPs.....	20
2.1.7	Kardiale Gewebeproben .....	20
2.1.8	Antikörper.....	21
2.1.9	Primer .....	21
2.2	Arbeiten mit Zellen.....	22
2.2.1	Isolation adulter Kardiomyozyten der Ratte.....	22
2.2.2	Kurzzeitkultur isolierter Kardiomyozyten.....	23
2.3	Arbeiten mit Proteinen.....	24
2.3.1	Ernte, Isolation und Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	24
2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	25

2.3.3	Western-Blot.....	26
2.3.4	Immunfärbung .....	27
<b>2.4</b>	<b>Arbeiten mit RNA/cDNA .....</b>	<b>28</b>
2.4.1	Isolation von RNA.....	28
2.4.2	Reverse Transkription .....	29
2.4.3	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	29
2.4.4	Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion .....	30
<b>2.5</b>	<b>Herstellung von Plasmidstandards für die quantitative PCR.....</b>	<b>31</b>
2.5.1	Elektrophorese und Gelextraktion .....	31
2.5.2	Klonierungsreaktion .....	32
2.5.3	Transformation .....	33
2.5.4	Plasmidpräparation (Mini-Präparation).....	34
2.5.5	Restriktionsanalysen.....	34
2.5.6	Sequenzierung .....	35
2.5.7	Plasmidpräparation (Midi-Präparation).....	36
<b>2.6</b>	<b>Quantifizierung der Zellvitalität .....</b>	<b>36</b>
<b>2.7</b>	<b>Messung der kontraktile Antwort im elektrischen Feld.....</b>	<b>38</b>
<b>2.8</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Expressionsanalysen an humanen Herzproben .....</b>	<b>41</b>
3.1.1	Expression von CTRP 1, 2, 7 und 9 im rechten Vorhof normosomer und adipöser Individuen verschiedener Altersgruppen .....	41
3.1.2	Expression von CTRP 7 und 9 im linken Ventrikel von Spendern sowie Patienten mit ischämischer- oder dilatativer Kardiomyopathie .....	43
<b>3.2</b>	<b>Einfluss von Adiponektin auf die Phosphorylierung der AMPK und der ACC in adulten Rattenkardiomyozyten .....</b>	<b>45</b>
<b>3.3</b>	<b>Einfluss von CTRP 1, 2, 7 und 9 auf die Phosphorylierung der AMPK und der ACC in adulten Rattenkardiomyozyten .....</b>	<b>46</b>
<b>3.4</b>	<b>Einfluss von Adiponektin und von CTRP 1, 2, 7 und 9 auf die Reaktion isolierter Kardiomyozyten auf oxidativen Stress.....</b>	<b>49</b>
3.4.1	Einfluss auf die Zellvitalität .....	49
3.4.2	Einfluss von CTRP 7 und 9 auf antioxidative Schutzmechanismen .....	56

<b>3.5</b>	<b>Einfluss von Adiponektin und der CTRPs 1, 2, 7 und 9 auf die kontraktile Antwort adulter Rattenkardiomyozyten im elektrischen Feld .....</b>	<b>59</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Expression der CTRPs: Ausmaß und Einflussfaktoren .....</b>	<b>63</b>
4.1.1	Kardiale Expression der CTRPs .....	63
4.1.2	Expression und Freisetzung der CTRPs in Abhängigkeit von Alter und Ernährungsstatus.....	63
4.1.3	Expression und Freisetzung der CTRPs im Rahmen kardialer Pathologien .....	65
<b>4.2</b>	<b>Einfluss von Adiponektin und der CTRPs 1, 2, 7 und 9 auf die AMPK und nachgeschaltete Signalwege .....</b>	<b>67</b>
<b>4.3</b>	<b>Protektive Effekte von Adiponektin und der CTRPs in Reaktion auf oxidativen Stress und die Rolle der AMP-aktivierten Proteinkinase .....</b>	<b>69</b>
<b>4.4</b>	<b>Einfluss von CTRP 7 und 9 auf Aktivität und Regulation von Komponenten des antioxidativen Schutzsystems .....</b>	<b>71</b>
<b>4.5</b>	<b>Einfluss von Adiponektin und der CTRPs auf die kontraktile Funktion des Herzens .....</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
<b>8.1</b>	<b>Abbildungen.....</b>	<b>80</b>
<b>8.2</b>	<b>Tabellen .....</b>	<b>82</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>10</b>	<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>10.1</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>99</b>
<b>10.2</b>	<b>Kongressbeiträge .....</b>	<b>100</b>
<b>11</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>101</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>102</b>
<b>13</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf .....</b>	<b>103</b>

## **1 Einleitung**

### **1.1 Das metabolische Syndrom und kardiovaskuläre Erkrankungen**

Kalorienreiche Ernährung, zahlreiche Umweltfaktoren sowie ein bewegungsarmer Lebensstil fördern das Auftreten des metabolischen Syndroms. Dieser Begriff umfasst eine bislang uneinheitlich definierte Gruppe miteinander verknüpfter kardiovaskulärer Risikofaktoren und Symptome [69]. Die Weltgesundheitsorganisation definiert das metabolische Syndrom als gemeinsames Auftreten von Diabetes mellitus, gestörter Glukosetoleranz oder gesteigertem Nüchternblutglukosewert mit mindestens zwei Nebenkriterien, zu denen arterielle Hypertonie, Dyslipidämie, Mikroalbuminurie sowie Adipositas gezählt werden [2]. Letztere bezeichnet eine überproportionale Vermehrung des Körperfettanteils [90]. Der Zusammenhang zwischen Adipositas und Erkrankungen des kardiovaskulären Systems wie beispielsweise Artherosklerose, Kardiomyopathien oder Herzversagen ist durch zahlreiche Studien belegt [31]. Die verantwortlichen Mechanismen und Interaktionen, insbesondere auf molekularbiologischer Ebene, sind dagegen noch nicht vollständig verstanden. Mit zunehmender Prävalenz der Adipositas vor allem in westlichen Schwellen- und Industrienationen [90] rückt die Erkenntnis, dass das Fettgewebe nicht nur als passiver Energiespeicher, sondern als endo- und parakrin aktives Organ zu betrachten ist [101], zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen.

### **1.2 Die endo- und parakrine Funktion des Fettgewebes**

Neben seiner passiven Funktion als Energiespeicher und Wärmeisolator produziert das Fettgewebe eine Vielzahl von Hormonen, die unter der Bezeichnung Adipozytokine zusammengefasst werden [73, 101]. Der zuerst beschriebene Vertreter dieser Fettgewebshormone ist das Leptin, ein 16 kDa großes Polypeptid [140]. Heute umfasst die Bezeichnung Adipozytokine eine große Gruppe von Hormonen und Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen, von denen einige Vertreter zusammen mit den wichtigsten Merkmalen in Tabelle 1 zusammengefasst sind. Das Fettgewebe lässt sich in weißes, braunes sowie in viszerales und subkutanes Fett unterscheiden und besteht neben reifen Fettzellen und Präadipozyten aus Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen. Letztere machen einen Anteil von bis zu 40% der Fettgewebszellen aus und sezernieren

proinflammatorische Zytokine, zu denen unter anderem die Interleukine 1 $\beta$ , 6 und 8 sowie der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* , TNF-  $\alpha$ ) gehören.

**Tabelle 1:** Vielfalt der Adipozytokine (aus [33]).

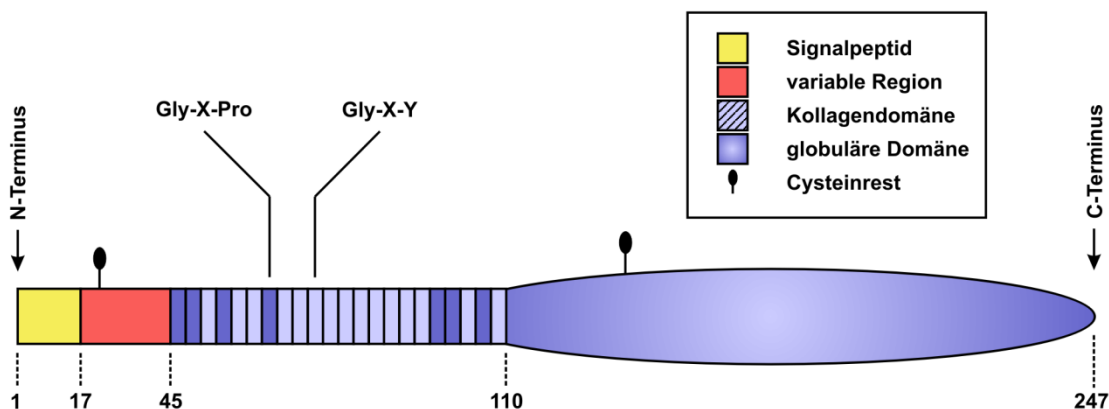
Adipozytokine	
Name	Auswirkung auf:
Leptin	Nahrungsaufnahme
Adiponektin	Insulinresistenz, Entzündung
Resistin	Insulinresistenz, Entzündung
Visfatin	Insulinresistenz
Omentin	Insulinresistenz
Vaspin	Insulinresistenz
Apelin	Vasodilatation
Cholesteryl-Ester-Transfer-Protein	Lipidmetabolismus
Lipoprotein Lipase	Lipidmetabolismus
Hormonsensitive Lipase	Lipidmetabolismus
<i>adipocyte fatty acid-binding protein 4</i>	Lipidmetabolismus
Perlipin	Lipidmetabolismus
Retinol-bindendes Protein 4	Lipidmetabolismus
<i>acylation stimulating protein</i>	Lipidmetabolismus
Adipsin	Entzündung
<i>macrophage chemo attractant protein-1</i>	Makrophagenchemokinese

Weiterhin wird im Fettgewebe eine Vielzahl an Mediatoren der Angiogenese gebildet [7, 99]. Mehrere Studien zeigen, dass das metabolische Syndrom an einen Zustand chronischer Inflammation mit erhöhter Nachweisbarkeit von Biomarkern der Entzündung gekoppelt ist [9]. Adipositas als wichtige Komponente dieses Syndroms resultiert nicht nur in einer Hyperplasie und -trophie der Adipozyten, vielmehr kommt es schon frühzeitig zu einer Imbalance der gebildeten Botenstoffe sowie einer gestörten Interaktion der verschiedenen Zelltypen auf lokaler Ebene [10]. Dem Einwandern weiterer Makrophagen und der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, assoziiert mit einem gesteigerten Risiko metabolischer und kardiovaskulärer Erkrankungen, wird in den letzten Jahren jedoch eine steigende Bedeutung beigemessen [3]. Zusätzlich fördert die Störung des Adipozytokinprofils die Entwicklung von Insulinresistenz, Artherosklerose und weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren [33].



### 1.3 Adiponektin: Struktur und Vorkommen

Das Adipozytokin Adiponektin wurde erstmals 1995 durch Lodish et al. sowie von drei weiteren unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben und zunächst aufgrund a) seiner Bildung durch Adipozyten, b) seiner strukturellen Ähnlichkeit zum Komplementfaktor C1q und c) seiner Größe von ca. 30 kDa als *adipocyte complement-related protein of 30 kDa* (Acrp30) bezeichnet [58, 102]. Adiponektin besteht aus 247 Aminosäuren und kann in vier Domänen untergliedert werden (Abbildung 1): Einem N-terminalen Signalpeptid schließt sich eine 27 Aminosäuren umfassende, sogenannte variable Region an, die in eine Kollagendomäne übergeht. Diese besteht aus einer Abfolge von 22 Kollagentriplets, wobei sich 7 Gly-X-Pro- mit 15 Gly-X-Y-Einheiten abwechseln. C-terminal befindet sich die globuläre Domäne, welche insgesamt 137 Aminosäuren umfasst. Strukturell ähnelt diese globuläre Domäne einer Reihe von Proteinen, unter anderem dem Komplementfaktor C1q [102]. Das in Abbildung 1 skizzierte Molekül wird auch als *full length* Form bezeichnet, wohingegen der Begriff globuläres Adiponektin ein Fragment, welches die globuläre Domäne enthält, beschreibt. Obwohl globuläres Adiponektin vielfach experimentell angewandt wird, ist bisher unklar, ob diese Form *in vivo* überhaupt existiert.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Struktur eines Adiponektinmoleküls (modifiziert nach [102]). Die abgebildeten Zahlen entsprechen der Aminosäureposition.

Unter physiologischen Bedingungen lagern sich *full length* Adiponektinmoleküle nicht-kovalent zu Trimeren zusammen, auch als *low molecular weight* (LMW) Adiponektin bekannt [83, 127]. Darüber hinaus ermöglichen Cysteinreste an den Positionen 22 sowie 138 über Disulfidbrücken die Bildung von Hexameren – uneinheitlich als *low* oder *middle*

*molecular weight* (MMW) Formen bezeichnet – sowie von Nona-, Dodeca- oder Octadecameren, welche als *high molecular weight* (HMW) Formen des Adipozytokins zusammengefasst werden [122]. Die Anordnung der Adiponektinmoleküle ist dabei für die Fähigkeit zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden relevant. So induzieren globuläres Adiponektin sowie Trimere den Signalweg der AMP-aktivierten Protein Kinase (AMPK), wohingegen ausschließlich Hexamere oder HMW-Formen den NF-κB-Signalweg aktivieren [105, 123].

#### **1.4 Modulation Adipositas-assoziiierter, kardiovaskulärer Pathologien durch Adiponektin**

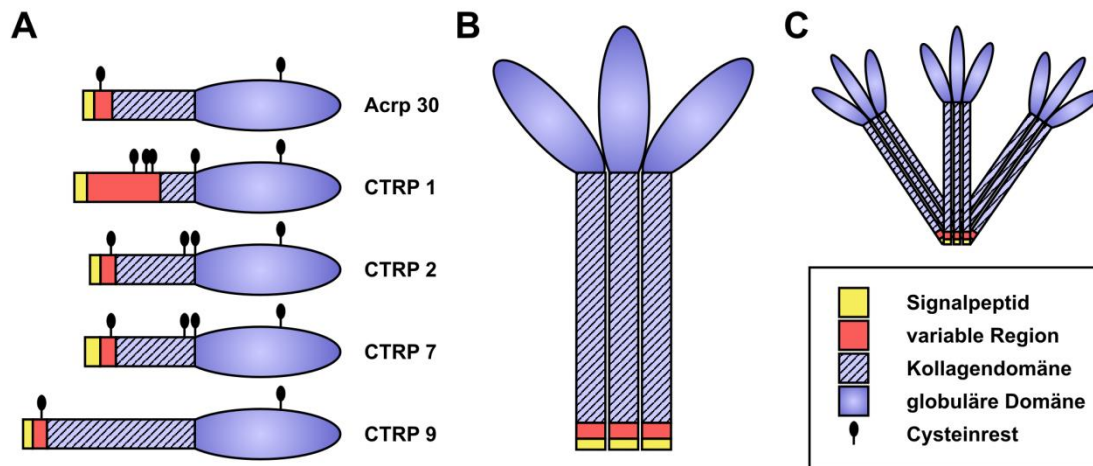
Der Zusammenhang zwischen Adipositas und Erkrankungen des kardiovaskulären Systems ist hinreichend bekannt [31]. Die Vermehrung des Fettgewebes geht dabei mit einer Störung des Adipozytokinprofils einher, was die Entwicklung von Artherosklerose sowie weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren begünstigt [10, 33]. Adiponektin wird überwiegend von Adipozyten gebildet und in das Blut abgeben [102]. Im menschlichen Blutkreislauf zirkuliert das Fettgewebshormon in Konzentrationen von ca. 2-17 µg/ml. Im Gegensatz zu anderen Adipozytokinen nimmt die Menge an zirkulierendem Adiponektin jedoch nicht mit der Masse an Fettgewebe zu. Bei Übergewichtigen ist der Plasmaspiegel signifikant verringert [4], ebenso bei Patienten, die zwar einen *Body Mass Index* (BMI) <25 aufweisen, jedoch an Diabetes Typ 2 erkrankt sind [41]. Im Gegenzug bewirkt eine Reduktion des Körpergewichts einen Anstieg der Adiponektinkonzentration im Plasma [139]. Neben metabolischen Funktionen, wie gesteigerter Glukoseaufnahme in Leber und Skelettmuskel sowie Zunahme der Fettsäureoxidation [138], werden dem Adipozytokin auch antiinflammatorische Wirkungen zugeschrieben [133, 139]. In der Literatur wird der Plasmaadiponektinspiegel als prädiktiver Faktor für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen diskutiert [64, 66]. Kumada et al. beschrieben einen Zusammenhang zwischen niedrigen Adiponektinspiegeln und dem Auftreten von koronarer Herzkrankheit in männlichen Probanden [64]. Gleichzeitig konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine Hypoadiponektinämie das Auftreten Adipositas-assoziiierter arterieller Hypertension fördert [87]. Ein positiver Effekt auf das Herz-Kreislauf-System scheint zudem nicht nur in Bezug auf das vaskuläre System, sondern auch durch den direkten Einfluss auf kardiale Pathologien zu bestehen. Im Mausmodell

schützt Adiponektin das Herz vor Ischämie-Reperfusionsschäden und führt zu einer Verringerung der Infarktgröße [107], während Hypoadiponektinämie die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (HI) beschleunigt [68]. Diese Unfähigkeit, ein ausreichendes Schlagvolumen zu fördern, gilt als gemeinsame Endstrecke einer Vielzahl kardialer Pathologien [57]. In einer Studie von Casselli et al. konnte anhand eines Schweinemodells gezeigt werden, dass die HI-bedingte myokardiale Reduktion der Acrp30-Expression mit einer gestörten kontraktilen Funktion des Herzens korreliert [12]. Als Bindeglied zwischen Metabolismus, Immun- und Herz-Kreislauf-System kommt dem Adipozytokin daher eine zunehmende Bedeutung zu.

## **1.5 C1q/tumor necrosis factor- $\alpha$ -related proteins: Paralogue des Adiponektins**

### **1.5.1 Struktur der Adiponektinparalogue**

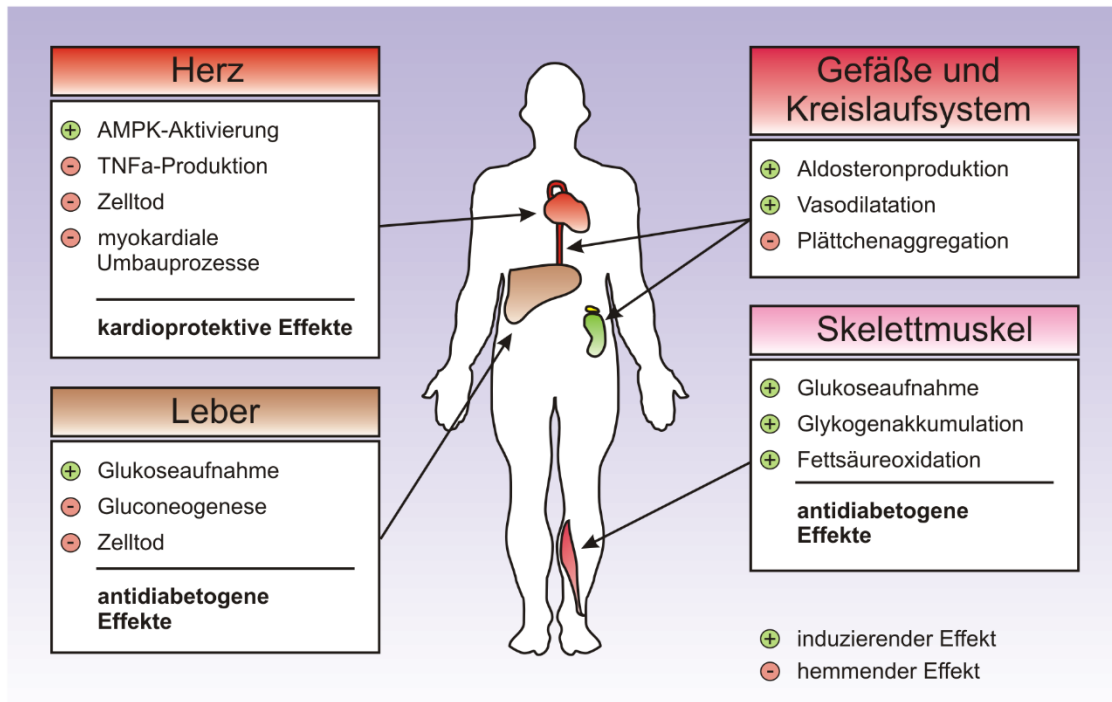
Die Bezeichnung *C1q/tumor necrosis factor- $\alpha$ -related proteins* (CTRPs) umfasst eine Gruppe hoch-konservierter Paralogue des Adiponektins. Die ersten Mitglieder dieser Proteinfamilie wurden 2004 von Wong et al. identifiziert [136]. Inzwischen sind 15 verschiedene CTRPs beschrieben, die wie Adiponektin der C1q-Proteinfamilie zugerechnet werden und denen eine Grundstruktur aus vier Domänen gemeinsam ist [61]. So findet sich auch bei den CTRPs ein N-terminales Signalpeptid, an welches sich eine kurze variable Region und eine Kollagendomäne anschließen. Am C-Terminus befindet sich die globuläre Domäne, die in ihrem Aufbau ebenfalls dem Komplementfaktor C1q entspricht [100]. Wie Abbildung 2 (B und C) zeigt, sind sowohl Adiponektin, als auch die CTRPs in der Lage, sich als Homotrimere zusammenzulagern, welche sich teilweise zu komplexeren Strukturen organisieren [100, 135]. Darüber hinaus formen CTRPs sowohl miteinander, als auch in Kombination mit Adiponektin Heterotrimere. Unter den genannten Paralogen weist CTRP 9 mit 54% Aminosäurehomologie der globulären Domäne die höchste Ähnlichkeit zu Adiponektin auf, gefolgt von CTRP 2 (42%), CTRP 7 (43%) und CTRP 1 (30%) [134]. Die CTRPs werden von verschiedenen Zellen und Geweben – unter anderem auch von Adipozyten – gebildet, wobei die einzelnen Paralogue individuelle Expressionsmuster aufweisen [135].



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Struktur und Vergleich von Adiponektin und CTRP 1, 2, 7 und 9 (modifiziert nach [100]). (A) Grundstruktur als Monomer mit Aufbau aus N-terminalem Signalpeptid, variabler Region, Kollagen- und globulärer Domäne sowie Cysteinresten; (B) homotrimere Anordnung aus 3 Monomeren; (C) komplexere Oligomer-Anordnung.

### 1.5.2 Biologische Funktionen von CTRP 1, 2, 7 und 9

Während die vielfältigen Wirkungen des Adiponektins in der Literatur ausgiebig analysiert wurden, ist die biologische Funktion der CTRPs bislang nur unvollständig bekannt. Abbildung 3 gibt einen Überblick über einige Funktionen der hier behandelten CTRPs. In bisherigen Studien werden CTRP 1 und 2 überwiegend bezüglich ihrer metabolischen Einflussnahme, insbesondere auf Glukose- und Fettstoffwechsel, diskutiert [136]. So bewirkt CTRP 1 in Mäusen eine Absenkung des Blutglukosespiegels [135] und trägt bei Überexpression in transgenen Tieren zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität bei [94, 95]. Beide CTRPs stimulieren die Aufnahme von Glukose, die Akkumulation von Glykogen sowie die Oxidation von Fettsäuren im Skelettmuskel [94, 95, 136]. Daneben scheint CTRP 1 direkt an der Regulation des Blutdrucks durch Beeinflussung der Aldosteronproduktion beteiligt zu sein [54]. Es hemmt zudem die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation, welche sowohl durch spontane Rupturen artherosklerotischer Plaques, als auch im Rahmen der interventionellen Revaskularisierung gefördert wird [65].



**Abbildung 3:** Überblick über die biologischen Funktionen der CTRPs.

Im Gegensatz zu CTRP 1 und 2 sind mögliche Funktionen von CTRP 7 bislang am wenigsten erforscht. Dagegen zeigen neuere Studien kardioprotektive Effekte von CTRP 9, wobei auch klassische Signalwege des Adiponektins eine Rolle zu spielen scheinen [56, 114]. Es ist bekannt, dass Veränderungen auf vaskulärer Ebene die Grundlage vieler kardialer Pathologien darstellen [22]. In einer Studie von Zheng et al. wurde durch Untersuchungen an C57BL/6-Mäusen sowie *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) gezeigt, dass CTRP 9 endothelabhängig vasodilatatorisch wirkt [142]. Über cAMP-abhängige Mechanismen scheint CTRP 9 außerdem der Bildung von Neointima vorzubeugen, wodurch es als potentieller Therapieansatz zur Verhinderung einer Gefäß-Restenose nach Angioplastie diskutiert wird [125]. Ein myokardialer Reperfusionsschaden konnte in 10-12 Wochen alten C57BL/6-Mäusen zudem durch Gabe von CTRP 9 verhindert werden [56]. Im ischämischen Herzen werden CTRP 9 positive Effekte, u.a. im Rahmen des *Remodellings* nach Myokardinfarkt, zugeschrieben. So verbesserte die Gabe von CTRP 9 in C57BL/6-Tieren das Überleben nach Myokardinfarkt und wirkte sich günstig auf kardiomyozytäre Apoptose und das Ausmaß myokardialer Fibrose aus [114].

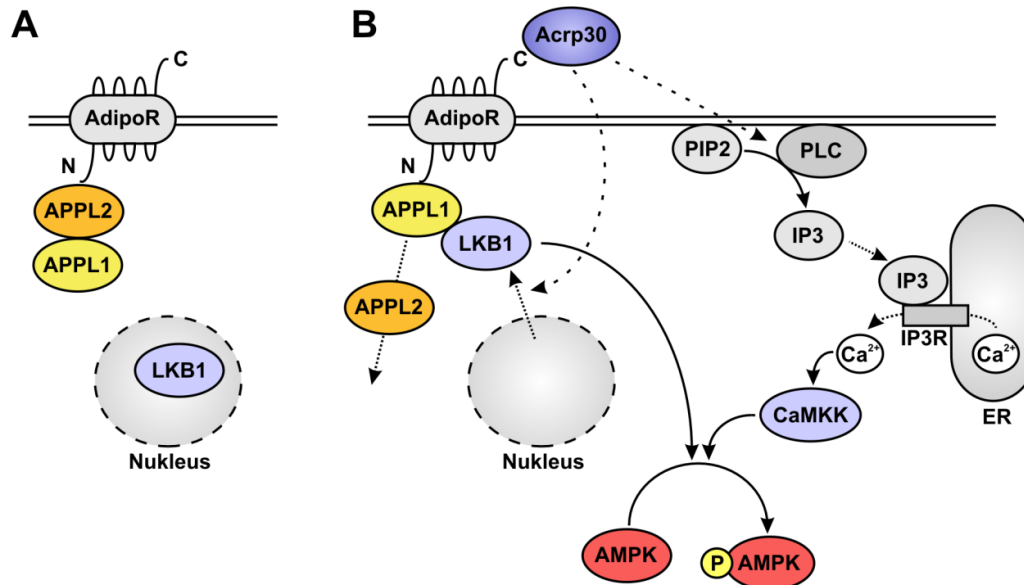
## 1.6 Adiponektinrezeptoren und nachgeschaltete Signalwege

Die Adiponektinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 wurden erstmals 2003 von Yamauchi et al. beschrieben. Beide enthalten sieben Transmembranhelices mit einem extrazellulären, C-terminalen Ende sowie einer intrazellulären N-terminalen Domäne, was sie von anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren unterscheidet [137]. Zwei Jahre nach der Erstbeschreibung wurden die Adiponektinrezeptoren einer gemeinsamen Superfamilie mit Progesteron- sowie anderen Rezeptoren unbekannter Funktion zugeordnet, den PAQRs (*progestin and adipoQ receptors*) [116]. Die 11 bisher bekannten PAQRs werden in drei Rezeptorklassen unterteilt, wobei AdipoR1 (PAQR 1), AdipoR2 (PAQR 2) sowie PAQR 3 und 4 als Klasse I zusammengefasst werden [109]. Garitaonandia et al. identifizierten Adiponektin als möglichen Liganden für PAQR 3 [29]. Im Gegensatz zu AdipoR1 und 2 ist PAQR 3 im Golgi-Apparat der Zelle lokalisiert und nimmt Einfluss auf Zellmigration und Proliferation, Kanzerogenese, aber auch auf Insulinsensitivität und zellulären Energiehaushalt [129-131]. Als dritter Adiponektinrezeptor wird in der Literatur T-Cadherin genannt [47]; die Funktion – eventuell als Co-Rezeptor, wie von Denzel et al. vermutet – bedarf derzeit jedoch noch weiteren Untersuchungen [21]. Daneben wird auch Calreticulin, insbesondere in Bezug auf antiinflammatorische Adiponektinwirkungen, als weiterer Acrp30-Rezeptor diskutiert [115]. Das Protein Calreticulin fungiert einerseits als Chaperon im endoplasmatischen Retikulum, ist andererseits aber auch als Co-Rezeptor u.a. für die Bindung an C1q auf der Zelloberfläche beschrieben [78]. Duus et al. konnten zeigen, dass Calreticulin mit Mitgliedern der C1q-Superfamilie, wie *cluster of differentiation 40 ligand* (CD40L), *mannan-binding lectin* (MBL), *tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), *Fas ligand* (FasL) sowie Acrp30 interagiert [24].

Obwohl davon ausgegangen wird, dass sowohl AdipoR1, als auch AdipoR2 ubiquitär in vielen menschlichen Geweben exprimiert werden [124], ist AdipoR1 vor allem in der Muskulatur detektierbar, wo der Rezeptor hauptsächlich globuläres Adiponektin bindet. Im Gegensatz dazu wird AdipoR2 mehrheitlich auf Hepatozyten nachgewiesen und bindet dort sowohl globuläres, als auch *full-length* Adiponektin [137]. Die Aktivität der Adiponektinrezeptoren wird durch Bildung von Homo- und Heterooligomeren auf der Zelloberfläche beeinflusst [137]. So konnte gezeigt werden, dass Adiponektin die Bildung von AdipoR1-Dimeren in menschlichem Muskelgewebe unterdrückt, wobei

davon ausgegangen wird, dass die monomere Form des Rezeptors für die Adiponektineffekte verantwortlich ist [63]. Ein wichtiger, intrazellulärer Interaktionspartner der AdipoRs ist das APPL1 (*adaptorprotein containing PH domain, PTB domain, and leucine zipper motif*) [74]. In Abwesenheit von Adiponektin bildet APPL1 einen dimeren Komplex mit seiner Isoform APPL2, gleichzeitig bindet APPL2 an den AdipoR-N-Terminus (Abbildung 4A). Die extrazelluläre Bindung von Acrp30 an den Adiponektinrezeptor bewirkt die Dissoziation beider Isoformen, wodurch APPL2 die Bindungsstelle des AdipoR freigibt und APPL1 binden kann [128]. In Muskelgewebe konnte gezeigt werden, dass dies die Translokation der *liver kinase* B1 (LKB1) aus dem Nukleus in das Zytosol bewirkt. Die Serin/Threonin-Kinase geht in Folge über die BAR- (Bin-Amphiphysin-Rvs-) Domäne eine Verbindung mit APPL1 ein und katalysiert die Phosphorylierung der AMPK an Position Thr172 [143]. Neben dieser Kaskade beschrieben Zhou et al. einen weiteren, in der AMPK-Phosphorylierung resultierenden Signalweg: Die Anwesenheit von Adiponektin bewirkt die hydrolytische Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2); das entstandene Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) induziert die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum. Im Zytosol stimulieren die Kalziumionen *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinases* (CaMKKs), welche wie auch LKB1 zur Phosphorylierung der AMPK führen (Abbildung 4B) [143].

Die AMPK ist als Mitglied der *AMP-activated/SNF1 Protein Kinase* Subfamilie Teil hoch-konservierter Protein-Kinase-Kaskaden in eukaryontischen Zellen und wesentlich an der Regulation von Metabolismus, Wachstum und Funktion der Zelle beteiligt [34]. Das Schlüsselenzym der Fettsäurebiosynthese, die *Acetyl-CoA-Carboxylase* (ACC), wird über Phosphorylierung an Position Ser79 durch die AMPK inaktiviert [11]. Unter den Adipozytokinen gilt Adiponektin als hormoneller Aktivator der AMPK in zahlreichen Gewebe- und Zelltypen. Der Zusammenhang zwischen metabolischen Störungen und kardialen Pathologien rückt die Proteinkinase, ihre Rolle im Herzen sowie als potentiell therapeutisches Ziel daher zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen.



**Abbildung 4:** Interaktion von AdipoR mit nachgeschalteten Signalwegen (modifiziert nach [36, 128, 143]). (A) In Abwesenheit von Adiponektin (Acrp30) bindet APPL2 an die N-terminale Domäne des Adiponektinrezeptors unter Dimerbildung mit APPL1. (B) Adiponektin bindet an AdipoR und bewirkt die Dissoziation des APPL-Dimers, wodurch APPL1 an den N-Terminus des Rezeptors bindet. APPL1 bewirkt die Translokation der Serin/Threonin-Kinase LKB1 aus dem Nukleus, welche die Phosphorylierung der AMPK katalysiert. Über Aktivierung der Phospholipase C (PLC) durch Acrp30 mit resultierender Freisetzung von Kalziumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) kommt es gleichzeitig zur Aktivierung der CaMKK, welche ebenfalls eine Phosphorylierung der AMPK bewirkt.

## 1.7 Reaktive Sauerstoffspezies und antioxidative Schutzmechanismen im Rahmen metabolischer und kardialer Pathologien

Der aerobe Organismus ist über die Cytochrom-C-Oxidase, welche sich in der mitochondrialen Membran eukaryonter Zellen befindet, in der Lage, Sauerstoff unter Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) zu reduzieren. Dabei können bereits im physiologischen Milieu Superoxid-Anionen entstehen, die zusammen mit Wasserstoffperoxid sowie dem Hydroxylradikal zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gezählt werden [76]. Diese instabilen Verbindungen können einerseits zelluläre Bestandteile wie DNA oder die Zellmembran schädigen, werden andererseits aber auch als wichtige Signalmoleküle diskutiert [18, 26, 76]. Komplexe enzymatische und nicht-enzymatische Mechanismen, die unter dem Begriff antioxidatives Schutzsystem zusammengefasst sind, dienen der Abwehr ROS-induzierter zellulärer Schäden und Funktionseinschränkungen [104]. Unter physiologischen Bedingungen katalysieren Superoxiddismutasen (SODs) die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und elementarem Sauerstoff aus



Superoxid-Radikalen [77]. Wasserstoffperoxid wird in weiteren Reaktionsschritten durch Katalasen, Glutathion-Peroxidasen (GPX) und Peroxiredoxine in weniger schädliche Verbindungen umgewandelt. Während die Katalase  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  und elementarem Sauerstoff katalysiert [16, 85], beschleunigen Glutathion-Peroxidasen mit Hilfe von Glutathion die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Bisher sind vier Isoformen dieser Proteine beschrieben, die als GPX 1-4 bezeichnet werden [20]. Peroxiredoxine, welche ebenfalls an der Umwandlung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  beteiligt sind [39], werden im oxidierten Zustand unter anderem durch das Redoxprotein Thioredoxin (Trx) regeneriert [40], wovon insgesamt 3 Isoformen bekannt sind [79, 112, 117].

Der pathologische Zustand der Adipositas ist durch ein Ungleichgewicht von Entstehung und Elimination der reaktiven Sauerstoffspezies gekennzeichnet, wobei dem Fettgewebe und der vermehrten Expression der Nikotinamidadenindinukleotidphosphat- (NADPH-) Oxidase eine bedeutende Rolle in der ROS-Produktion beigemessen wird [28]. Gleichzeitig ist die Expression und Aktivität der beschriebenen antioxidativen Enzyme im Fettgewebe adipöser Individuen reduziert [28, 62, 88, 89]. Die Zunahme von oxidativem Stress beschleunigt die Entwicklung weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren, wie Diabetes und Artherosklerose [37, 43]. Erkrankungen des kardiovaskulären Systems führen zudem zu einer Verschlechterung der Sauerstoffversorgung des Herzens und einer verstärkten Bildung von ROS [49, 72].

## **1.8 Fragestellung**

Das Adipozytokin Adiponektin stellt ein wichtiges Bindeglied zwischen Metabolismus, Immun- und kardiovaskulärem System mit kardioprotektivem Potential dar. Die strukturelle Ähnlichkeit der CTRPs als Mitglieder der C1q-Proteinfamilie und Adiponektinparaloge lässt ähnliche Funktionen vermuten. Daher steht in der vorliegenden Arbeit die Beantwortung der folgenden Fragen im Mittelpunkt:

- (1) In welchem Ausmaß werden die CTRPs 1, 2, 7 und 9 im Rahmen von Erkrankungen wie Adipositas, bei Herzinsuffizienz oder im Alter differentiell exprimiert?
- (2) Welchen Einfluss nehmen CTRP 1, 2, 7 und 9 im Vergleich zu Adiponektin auf die Aktivierung der AMPK-Signalkaskade in Kardiomyozyten der Ratte?
- (3) Schützen Adiponektin und die genannten Adiponektin-Paraloge Kardiomyozyten vor oxidativem Stress? Welche Schutzmechanismen sind hierbei involviert und welche Rolle spielt die AMPK-Signalkaskade in der Vermittlung dieser Effekte?
- (4) Welchen Einfluss üben Adiponektin und die beschriebenen CTRPs auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten aus?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Brutschrank BBD 6220 Heraeus	Thermo Scientific, Langenselbold
Fusion Fx7 Detektionssystem	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Feinwaage ALJ 160-4NM	KERN & Sohn GmbH, Balingen
Glasgeräte	Schott, Mainz
Interface INT4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Kapselpinzette	Eickemeyer, Tuttlingen
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Physiologisches Institut, Universität Gießen
Magnetrührer L-73	Kisker-Biotech, Steinfurt
Mikroplatten-Lesegerät Infinite <sup>TM</sup> M200	Tecan Group Ltd., Männedorf
Mikroskop Olympus IX70	Olympus, Hamburg
Mikroskop TMS-F Typ 102	Nikon GmbH, Düsseldorf
Monitor Typ Observation Monitor	Philips Deutschland GmbH, Hamburg
Nano Drop <sup>®</sup> ND-1000	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik, Bad Blankenburg
Oszillograph OS-9020A	GoldStar Co., Korea
pH-Meter HI 223	HANNA Instruments GmbH, Kehl am Rhein
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Schüttler KS 250 basic	Schütt Labortechnik, Göttingen
Schwenkschüttler Unitwist R7	Kisker-Biotech, Steinfurt
Sterilbank Hera Safe KS	Thermo Scientific, Langenselbold
Stimulator	Eigenbau, Physiologisches Institut, Universität Gießen
Thermocycler Mx3000P	Stratagene Co., La Jolla (USA)
Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen
Gewebezerhacker	HSE, March-Hugstetten
Ultraschallstoßgerät Labsonic U	B. Braun AG, Melsungen
UV-Tisch	Schütt Labortechnik, Göttingen
Vortexmischer Top-Mix 11118	Fisher Bioblock Scientific, Schwerte
Wasserbad GFL <sup>®</sup>	Schütt Labortechnik, Göttingen

Zeilenkamera ZK4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Zentrifuge Haereus Fresco 17	Thermo Scientific, Langenselbold

### 2.1.2 Software

CorelDRAW Version 11.0	Corel GmbH, München
FUSION-CAPT <sup>TM</sup> Software Version 15.0	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell
MuCELL	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Sigma Plot Version 10.0	Systat Software GmbH, Erkrath
Sigma Stat Version 3.5	Systat Software GmbH, Erkrath
Tecan Magellan Version 6.6	Tecan Group Ltd., Männedorf
Quantity One <sup>®</sup> Version 4.3.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vector NTI Advance 9	Invitrogen Co., Carlsbad (USA)

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

15 ml Röhrchen Typ Falcon	Becton Dickinson, Canaan (USA)
50 ml Röhrchen Typ Cellstar <sup>®</sup> Tubes	Greiner, Frickenhausen
96-Well-Mikroplatten	Greiner, Frickenhausen
Blottpapier	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Küvetten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nylonnetz (Polyamid, 200 µm)	NeoLab, Heidelberg
PCR-Streifen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen, diverse	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5 - 2 ml) Safe Seal micro tube	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Nitrozellulosemembran Whatman <sup>TM</sup>	
ProTran BA85	GE Healthcare, München
Zellkulturschalen Falcon	Becton Dickinson, Canaan (USA)
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen

**2.1.4 Chemikalien**

Acrylamid/Bisacrylamidlösung	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Adenine 9- $\beta$ -D-arabinofuranoside (AraA), Minimum 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniom persulfate (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Aqua bidestillata	B. Braun, Melsungen
Chloroform, Minimum 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D(+)-Glucose anhydrous	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Minimum 99,9%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNA-Leiter 100 bp DNA Ladder N2321G	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Desoxyribonukleosidtriphosphat- (dNTP-) Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethanol	Riedel-deHaën, Seelze
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fetal bovine serum (FBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (AU)
GelRed <sup>TM</sup> Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Haywood (USA)
Glukose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glycin	Roth, Karlsruhe
GoTaq <sup>®</sup> DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Hoechst33258	Invitrogen, Karlsruhe
Isoproterenol	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Kollagenase Typ CLSII (332 U/mg)	Biochrom, Berlin
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Luria broth (LB) Agar	Roth, Karlsruhe
Luria broth (LB) Medium	Roth, Karlsruhe
Medium 199/Earl's Salts	Biochrom, Berlin

Methanol	Merck, Darmstadt
Metformin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
PageRuler™ Prestained Protein	
Ladder Plus SM 1811	Fermentas, St. Leon-Rot
PBS Tablets	GIBCO™ Invitrogen Corporation (UK)
Penicillin / Streptomycin	Biochrom KG, Berlin
PfuUltra HF DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Phosphatase Inhibitor	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Primer (diverse)	Invitrogen, Karlsruhe
2-Propanol	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Restriktionsenzyme (diverse)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RNase A	Roth, Karlsruhe
RNase-Exitus Plus™	AppliChem GmbH, Darmstadt
RNase Out	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Riedel-deHaën, Seelze
SDS ultrapur	Roth, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRIzol-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-(Hydroxymethyl)- Aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trockenmilchpulver	Milbona, Neckarsulm
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D- Galactopyranoside (X-Gal)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30%	AppliChem GmbH, Darmstadt

### 2.1.5 Kit-Systeme

E.Z.N.A. <sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit II	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGOLD Gel Extraction Kit	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pierce <sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Langenselbold
Platinum <sup>®</sup> SYBR <sup>®</sup> Green qPCR	
SuperMix-UDG	Invitrogen, Karlsruhe
Pure Link <sup>™</sup> Hi Pure Plasmid	
Midprep Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO <sup>®</sup> TA Cloning <sup>®</sup> Kit	
for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.6 CTRPs

Die in dieser Arbeit verwendeten CTRPs wurden innerhalb der Arbeitsgruppe mittels Affinitätschromatographie aus *E. coli* (Stamm BL21(AI3), Stratagene, Heidelberg) isoliert. Entsprechende Fragmente wurden zuvor mittels LR-Rekombination vom Eingangsvektor (pENTR<sup>™</sup> TOPO<sup>®</sup>) in den Zielvektor (pDEST 17) eingebracht.

### 2.1.7 Kardiale Gewebeproben

Die kardialen Gewebeproben entstammen Patienten der Universitätsklinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum Halle (Saale). Ein Votum der Ethikkommission der Universität Halle-Wittenberg vom 02.08.2005 sowie eine Anschlussbegutachtung der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen vom 27.05.2010 (AZ 65/10) liegen vor. Der Probengewinnung gingen die Aufklärung der Patienten und das Einholen des schriftlichen Einverständnisses voraus.

### 2.1.8 Antikörper

**Tabelle 2:** Herkunft und Eigenschaften der eingesetzten Antikörper

Antikörper	Spezies	Firma	eingesetzte Verdünnung
Anti-CTRP 7 (human)	Kaninchen	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln	1:500
Anti-CTRP 9 (human)	Kaninchen	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln	1:500
Anti-GAPDH	Kaninchen	Abcam , Cambridge (USA)	1:1.000
Anti-phospho-ACC (Ser79)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)	1:500
Anti-phospho-AMPK $\alpha$ (Thr172)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)	1:500
Anti-Rabbit IgG, HRP-konjugiert	Ziege	Santa-Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	1:10.000

### 2.1.9 Primer

**Tabelle 3:** Eigenschaften der eingesetzten Primer

	Spezies	Primer	Sequenz (5' zu 3')	Fragmentlänge (bp)
Catalase	Ratte	sense antisense	CCTGACATGGTCTGGGACTT CAAGTTTTTGATGCCCTGGT	200
CTRP 1	Mensch	sense antisense	AGAGGGCTGAAGAACAACATGA TACATGGAGGTACCAGGGTCA	99
CTRP 2	Mensch	sense antisense	GACCTTTGATGCCAACACCG GGCTGTCTGTCCAGTAAGGG	142
CTRP 7	Mensch	sense antisense	AGAGGTAAGACTGGACCGCTA GCTTCCACATCTGCAAACCTCC	186
CTRP 9	Mensch	sense antisense	AGCCCTAGGGTCCAGTTCAG ATCGCCTTTGTCACCCTTCG	199
GPX 1	Ratte	sense antisense	TCGGACATCAGGAGAATGGCAAGA GATCGTCACTGGGTGCTGGC	177
GPX 2	Ratte	sense antisense	TGGCTTACATCGCCAAGTCT CGAACTGGTTGCAAGGGAAG	212
MnSOD	Ratte	sense antisense	ATCTGAACGTCACCGAGGAG TGCAGTGGGTCTGTGATTAGA	330
SP6 long	Sequenzierprimer		ACTTAGAAGTGAGTATGAGTAC	-
T7	Sequenzierprimer		TAATACGACTCACTATAGGG	-
Trx 1	Maus	sense antisense	GCTGATCGAGAGCAAGGAAG CCCACCTTTTGACCCTTTTT	251
Trx 2	Maus	sense antisense	CCCCTCAGTACAATGCTGGT CTAGCTGGTCTCGTCCTTG	371



## 2.2 Arbeiten mit Zellen

### 2.2.1 Isolation adulter Kardiomyozyten der Ratte

Die adulten Kardiomyozyten wurden mit Hilfe eines Langendorff-Perfusionssystems, wie von Schlüter et al. [103] beschrieben, aus den Herzen männlicher und weiblicher Wistar-Ratten isoliert. Dazu wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert und mittels Genickbruch getötet. Danach wurde der Thorax eröffnet und mit eiskalter NaCl-Lösung gespült. Das Herz wurde entnommen und in eine mit eiskalter NaCl-Lösung gefüllte Petrischale verbracht. Nach Entfernen von nicht-kardialen Geweberesten wurde das Herz über die Aorta an die Perfusionskanüle des Langendorff-System angeschlossen und mit einer Krokodilklemme fixiert. Bei diesem Vorgang war darauf zu achten, dass die Kanüle nicht zu weit in das Herz eingebracht wurde, um eine Zerstörung der Aortenklappe zu verhindern und die Perfusion über die Koronararterien zu gewährleisten. Vor Anbringen des Herzens wurde das System mit 37°C warmen Powell-Perfusionsmedium mit einer Geschwindigkeit von einem Tropfen pro Sekunde durchflutet.

**Tabelle 4:** Zusammensetzung des Powell-Perfusionsmediums

Powell-Perfusionsmedium	
NaCl	110 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mmol/l
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mmol/l
NaHCO <sub>3</sub>	25 mmol/l
Glukose	11 mmol/l

Die Aorta wurde nun mit einem Leinenfaden fest an die Kanüle gebunden und die Krokodilklemme abgenommen. Durch Spülen des Herzens mit Perfusionsmedium für 3-5 Minuten wurde das verbliebene Blut aus dem Organ entfernt. Anschließend wurde die Reperfusion des Herzens mit Kollagenase-Puffer (50ml Powell-Perfusionsmedium, 20 mg Kollagenase, 12,5 µl Kalzium-Stammlösung (100 mmol/l)) für 25 Minuten gestartet. Das Herz wurde danach von der Apparatur gelöst und jeweils sowohl linker als auch rechter Ventrikel mit Hilfe eines Skalpells von den Vorhöfen und der Aorta getrennt. Nach

mechanischer Zerkleinerung der Ventrikel wurden diese für 5 Minuten mit auf 37°C vorgewärmten Kollagenasepuffer nachverdaut. Während dieses Vorgangs wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren des Zellverbundes die Isolation der Kardiomyozyten beschleunigt. Nach Filtrieren mittels eines Nylon-Filters mit einer Porengröße von 200 µm wurde die gewonnene, nun von Zelltrümmern und Kollagenase-Puffer befreite Zellsuspension für 3 Minuten bei 400 U/min zentrifugiert. Der Überstand, welcher Endothelzellen und Fibroblasten enthält, wurde abgesaugt und das Kardiomyozyten-Pellet in 10 ml Powell-Medium mit einem CaCl<sub>2</sub>-Gehalt von 200 µmol/l überführt. Nach erneutem Zentrifugieren für 3 Minuten bei 400 U/min wurde das Pellet nun in 10 ml Powell-Medium mit einem CaCl<sub>2</sub>-Gehalt von 400 µmol/l resuspendiert. Diese Suspension wurde in bereits zu 2/3 mit einem BSA- (bovines Serumalbumin-) Gradienten (50 ml Powell-Perfusionsmedium, 2 g BSA, 500 µl CaCl<sub>2</sub> (100 mmol/l)) befüllte Reagenzgläser aufgenommen und für eine Minute bei 300 U/min zentrifugiert. Die im Pellet konzentrierten stäbchenförmigen Kardiomyozyten konnten nun in das bereits auf 37°C vorgewärmte CCT-Kulturmedium (modifiziertes Medium M199) überführt werden.

### **2.2.2 Kurzzeitkultur isolierter Kardiomyozyten**

Die resuspendierten Kardiomyozyten wurden in CCT-Medium für 24-48 Stunden bei 37°C unter CO<sub>2</sub>-freien Bedingungen kultiviert. Eine länger andauernde Kultur wird dabei durch eine kontinuierliche Abnahme der Zahl vitaler, stäbchenförmiger Kardiomyozyten limitiert. Das CCT-Kulturmedium (5,0 l M199, 5 mmol/l Creatinin, 2 mmol/l Carnitin, 5 mmol/l Taurin, 100 U/ml Penicillin / Streptomycin, 10 µmol/l Cytosin-β-Arabinofuranosid) wurde in einem Endvolumen von fünf Litern hergestellt, sterilfiltriert und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung zwischengelagert. Das eingesetzte Medium 199 (M199) wurde mit HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure, 15 mmol/l) gepuffert und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Cytosin-β-Arabinofuranosid diente der Vermeidung des Wachstums nicht-kardiomyozytärer Zellen. Zum Erreichen einer möglichst hohen Dichte an Kardiomyozyten auf dem Boden der Zellkulturschalen wurden diese 24 Stunden vor der Isolation mit Vorinkubationsmedium (1 ml / 10 cm<sup>2</sup> Schale) benetzt. Das Vorinkubationsmedium bestand aus CCT-Medium unter Zusatz von 4% fetalem

Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) und wurde vor Einbringen der Kardiomyozyten abgesaugt. Nach dem Ausplattieren wurden die Zellen 1,5 Stunden unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert. In dieser Zeit hefteten sich die Zellen an den Boden der Kulturschalen. Nach Wechsel des Mediums zum Entfernen nicht adaptierter und toter Zellen konnten die Kardiomyozyten je nach Versuchsprotokoll stimuliert werden.

## **2.3 Arbeiten mit Proteinen**

### **2.3.1 Ernte, Isolation und Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Zur Ernte von Protein aus den kultivierten Zellen wurde zuerst das Stimulationsmedium abgesaugt. Zelltrümmer oder nicht mehr am Schalenboden haftende Kardiomyozyten oder Kardiomyoblasten wurden durch einmaliges Waschen mit eiskaltem PBS (1ml / 10 cm<sup>2</sup> Schale) entfernt. Die Entnahme der verbliebenen Zellen erfolgte auf Eis durch Zugabe von 80-120 µl / 10 cm<sup>2</sup> SDS-Lysepuffer, welcher sich aus einem geeigneten Volumen 1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris (pH 8,1), Phosphatase-Inhibitor (1:50) sowie Protease-Inhibitor (1:250) zusammensetzte und auf einen pH-Wert von 8,1 eingestellt war. Dem Ablösen mit einem Zellschaber folgte die Überführung der Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäße. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese entweder auf Eis oder bei -80°C zwischengelagert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mittels 5-sekündiger Ultraschallbehandlung (Ultraschallstoßgerät Labsonic U von B. Braun) lysiert. Nach Inkubation auf Eis für 30 Minuten wurden die Proben 10 Minuten bei 14.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße verbracht und auf Eis zwischengelagert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben kam das Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) zur Anwendung. Als Standard diente BSA mit einer Konzentration von 2,0 mg/ml, welches durch Verdünnung mit Aqua bidest in Konzentrationen von 0 mg/ml (Leerwert) bis 2,0 mg/ml eingesetzt wurde. Diese Standardreihe konnte bei -20°C zwischengelagert werden. Von den Proteinproben wurden zudem 1:10-Verdünnungen hergestellt. Zur eigentlichen Messung wurden je 10 µl Kontrolle (Leerwert), 10 µl Standard in aufsteigender Konzentration sowie 10 µl verdünnte Probe in die Vertiefungen einer 96-Well-Mikroplatte (Greiner) pipettiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von je 200 µl Reagenzgemisch, welches sich aus den Reagenzien A und B in einem

Verhältnis von 50:1 zusammensetzte. Einer 30-minütigen Inkubation der Platte bei 37°C schloss sich die Vermessung im Mikroplatten-Lesegerät Infinite™ M200 (Tecan Group Ltd) an. Die ermittelten Konzentrationen ermöglichten die Herstellung von Proben mit gleichem Proteingehalt durch entsprechende Verdünnung mit Aqua bidest.

### 2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld kam die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Anwendung. Das Gießen der Acrylamidgele erfolgte zwischen zwei Glasplatten, die in die Gelapparatur eingespannt waren und durch gläserne Abstandshalter das Herstellen von 1,5 mm dicken Gelen ermöglichten. Zunächst wurde das Trenngel hergestellt und zwischen die Glasplatten gegossen. Durch Zugabe von APS und TEMED wurde die Polymerisation des Acrylamids beschleunigt. Mit Hilfe von Isopropanol konnte Blasenbildung bzw. das Entstehen einer unebenen Abschlussfläche des Gels vermieden werden. Nach einer Polymerisationsphase von 15 Minuten wurde das Isopropanol abgegossen und die Oberkante des Gels mit destilliertem Wasser gereinigt. Anschließend wurde das Sammelgel in die Apparatur eingefüllt und die Kämme zur Bildung von 10 bzw. 15 Spuren angebracht. Tabelle 5 zeigt die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel:

**Tabelle 5:** Zusammensetzung der Western-Blot-Gele (Angaben zur Herstellung eines Gels)

	Trenngel		Sammelgel
Konzentration	5%	10%	
steriles Wasser	5,80 ml	4,30 ml	2,95 ml
40 % Acrylamid	1,50 ml	3,00 ml	0,50 ml
Puffer (1,5 M Tris, pH 8,8)	4,50 ml	4,50 ml	-
Puffer (1 M Tris, pH 6,8)	-	-	0,50 ml
10% SDS	120 µl	120 µl	40 µl
10x APS	100 µl	100 µl	25 µl
TEMED	10 µl	10 µl	5 µl

Nach weiteren 15 Minuten wurden die getrockneten Gele mit ihrer Halterung in die Gelkammer eingespannt und diese je nach Anzahl der eingesetzten Gele bis zur entsprechenden Markierung mit Laufpuffer aufgefüllt.

**Tabelle 6:** Zusammensetzung des Laufpuffers

Laufpuffer	
Tris	3,03 g
Glycin	14,42 g
SDS 20%	5,00 ml
Aqua bidest	ad 1.000 ml

Die mit 6xSDS-Puffer versetzten Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C denaturiert, schnellzentrifugiert und bis zum Einsetzen auf Eis zwischengelagert. Nach Entfernen der Kämme ermöglichten die entstandenen Geltaschen das Auftragen von je 20 µl Proteinprobe. Zusätzlich wurden pro Gel 3 µl Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus SM 1811; Fermentas) aufgetragen. Bei einer Spannung von 1,7 V/cm<sup>2</sup> konzentrierten sich die Proteine an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel, von wo aus sie ca. 120 min bei einer Spannung von 3 V/cm<sup>2</sup> in Richtung Anode wanderten. Die Blaufärbung der Proben durch das SDS erlaubte eine Aussage darüber, zu welchem Zeitpunkt die ersten Proteine die Unterkante des Trenngels erreicht hatten.

### 2.3.3 Western-Blot

Zur elektrophoretischen Übertragung der im Gel befindlichen Proteine auf eine Nitrocellulosemembran kam das *Wet-Transfer*-Verfahren zur Anwendung [120]. Dazu wurden zunächst Netzschwämme, Whatman-Filterpapiere, sowie die Nitrocellulosemembran mit Blotpuffer (Tabelle 7) für ca. 5-10 Minuten befeuchtet. Nach Auseinanderbauen der Gelapparatur wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Der Blotsandwich wurde wie folgt in der Halterung der Blotapparatur zusammengesetzt: 1) Netzschwamm, 2) zwei Whatman-Filterpapiere, 3) Nitrocellulosemembran, 4) Proteingel, 5) zwei Whatman-Filterpapiere, 6) Netzschwamm.

**Tabelle 7:** Zusammensetzung des Blotpuffers

Blotpuffer	
Tris	3,03 g
Glycin	14,42 g
Methanol	200 ml
SDS 10%	2,00 ml
Aqua bidest	ad 1.000 ml

Die verschlossene Halterung wurde zusammen mit zwei Kühlakkus in die Blotapparatur eingesetzt. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgte für eine Stunde bei 4°C mit einer Spannung von 100 V.

#### 2.3.4 Immunfärbung

Zunächst wurden die unbesetzten Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran mit Blockierungslösung, welche aus 5% in *tris-buffered saline tween* (TBS-T, Tabelle 8) gelöstem Trockenmilchpulver bestand, für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit der entsprechenden Primärantikörperlösung (2,5% Trockenmilch in TBS-T, Primärantikörper in entsprechender Verdünnung) bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T für je 10 Minuten gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörperlösung (2,5% Trockenmilch in TBS-T, Sekundärantikörper 1:10.000) inkubiert. In dieser Arbeit kamen dazu Sekundärantikörper, welche mit *horse radish peroxidase* (HRP) konjugiert waren, zur Anwendung.

**Tabelle 8:** Zusammensetzung von TBS-T

TBS-T	
NaCl	8,0 g
Tris	12,1 g
Tween 20	2,0 ml
Aqua bidest	ad 1.000 ml

Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T folgte die Inkubation der Nitrocellulosemembran mit *Enhanced Chemo Luminescence* (ECL)-Lösung, welche die HRP-Enzymreaktion startete und die sich aus 10 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,5), Luminol (250 mM), Cumarsäure (90 mM) sowie Wasserstoffperoxid (1:2.000) zusammensetzte. Die Chemilumineszenzsignale der markierten Proteinbanden wurden mit Hilfe des Detektionssystems Fusion Fx7 (peQLab) registriert und die entstandenen Bilder über die FUSION-CAPT<sup>TM</sup> Software (Vilber Lourmat) dokumentiert. Der Auswertung der Bildinformationen durch das Programm Quantity One<sup>®</sup> (BioRad) folgte die statistische Aufarbeitung der Daten mit dem Statistikprogramm Sigma Stat (Systat Software Inc.).

## **2.4 Arbeiten mit RNA/cDNA**

### **2.4.1 Isolation von RNA**

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen in TRIzol (Invitrogen) lysiert und anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben konnten nun entweder direkt weiterverarbeitet, oder bei -80°C zwischengelagert werden. Zur Isolation der RNA aus den gewonnenen Proben wurden diese gegebenenfalls 10 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut, anschließend unter einem Abzug mit Chloroform im Verhältnis 1:5 des zuvor eingesetzten TRIzol-Volumens versetzt und mit Hilfe eines Vortexmischers homogenisiert. Es folgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten, der sich ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm bei 4°C anschloss. Die sich nun ausgebildeten 3 Phasen setzten sich zusammen aus einer wässrigen Oberphase, welche die RNA enthielt, einer DNA-enhaltenden Interphase und einer phenolischen Unterphase mit Proteinen. Die in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführte Oberphase wurde mit der Hälfte an eingesetztem TRIzol-Volumen mit Isopropanol versetzt, gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA-Fällung erfolgte durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 14.000 U/min und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 75% Ethanol gewaschen. Dazu wurde das im Reaktionsgefäß verbliebene Pellet zunächst mit 500 µl Ethanol versetzt und 10 Minuten mit 14.000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das gereinigte Pellet für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und die RNA schließlich in einem geeigneten Volumen Diethylpyrocarbonat-(DEPC-)Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte ab diesem Schritt bei weiterer Verwendung auf Eis oder bei

-80°C. Die Konzentration der isolierten RNA wurde am Photometer (Nano Drop® ND-1000, peQLab) gemessen und die Proben wenn nötig verdünnt. Im nächsten Schritt folgte die Reverse Transkription (RT) oder die Zwischenlagerung bei -80°C.

### 2.4.2 Reverse Transkription

Von jeder Probe wurde zunächst ein 10 µl Probenansatz (500 ng konzentrierte RNA in DEPC-Wasser) hergestellt, welcher zum Aufschmelzen von Sekundärstrukturen für 3 Minuten bei 72°C denaturiert wurde. Anschließend folgte die Zugabe von je 15 µl RT-Mix (Tabelle 9) und eine 30-minütige Inkubation bei 42°C.

**Tabelle 9:** Zusammensetzung des RT-Mix

RT-Mix	
RT-Puffer	5,0 µl
dNTPs (12,5 mM)	1,0 µl
Random Primer (1:125)	3,0 µl
RNase Inhibitor	0,25 µl
Reverse Transkriptase	0,25 µl
DEPC-Wasser	5,5 µl

Durch einminütiges Erhitzen der Proben auf 95°C wurde die Enzymaktivität der Reversen Transkriptase gestoppt. Die entstandene cDNA wurde auf 4°C abgekühlt und mit Aqua bidest im Verhältnis 1:1 verdünnt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der Proben bei -20°C.

### 2.4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

In dieser Arbeit erfolgte die DNA-Amplifikation mit Hilfe der GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega). In Tabelle 10 ist die Zusammensetzung eines PCR-Mastermix-Ansatzes aufgeführt. Je 2 µl Probe oder Aqua bidest, welches als Negativkontrolle (*no template control*, NTC) diente, wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 23 µl Mastermix-Ansatz. Die Reaktionsgefäße



wurden in den Thermocycler T3 (Biometra) verbracht und das PCR-Programm gestartet. Einem initialen Denaturierungsschritt für 2 Minuten bei 95°C folgten je nach Expressionstärke 20-40 PCR Zyklen, wobei die Dauer der einzelnen Schritte (Denaturierung, Annealing, Extension) bei 30 Sekunden und die Annealingtemperatur bei  $60 \pm 10^\circ\text{C}$  je nach eingesetztem Primer lag. Die Eigenschaften der verwendeten Primer sind in Tabelle 3, Seite 21 aufgeführt.

**Tabelle 10:** Zusammensetzung des PCR-Mastermix-Ansatzes

<b>PCR-Mastermix-Ansatz (1x)</b>	
Aqua bidest	12,37 $\mu\text{l}$
5x Green GoTaq <sup>®</sup> Flexi Buffer	5,0 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 $\mu\text{l}$
dNTPs (100 $\mu\text{M}$ )	3,0 $\mu\text{l}$
Sense-Primer (10 pmol)	0,5 $\mu\text{l}$
Antisense-Primer (10 pmol)	0,5 $\mu\text{l}$
GoTaq <sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase	0,13 $\mu\text{l}$

Nach Durchlaufen der gewünschten Zyklenzahl erfolgte die einstündige elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einem Agarosegel (1% Agarose in TBE) bei einer Spannung von 80-160 V je nach Gelgröße. Dazu wurde die Agarose in TBE aufgekocht und nach Zugabe von GelRed<sup>™</sup> (1:10.000, Biotium) in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach Polymerisation des Gels konnten die zuvor eingesetzten Kämme entfernt und die Proben sowie eine DNA-Leiter (DNA Ladder N2321G, New England Biolabs) aufgetragen werden. Das dem Agarosegel zugesetzte GelRed<sup>™</sup> erlaubte die zusammen mit der ebenfalls aufgetragenen DNA-Leiter 100 bp DNA Ladder N2321G (New England Biolabs) die Analyse der Banden mit Hilfe des Detektionssystems Fusion Fx7 (peQLab).

#### 2.4.4 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion

Die quantitative PCR ermöglicht die exakte Bestimmung der DNA-Molekülzahl in einer Probe und basiert auf der Anlagerung von Fluoreszenzfarbstoffen an doppelsträngige

DNA, wobei die Intensität der gemessenen Fluoreszenzsignale beim Durchlaufen der einzelnen PCR-Zyklen proportional zur Menge neu amplifizierter DNA zunimmt [15, 35]. In dieser Arbeit kam der Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) zur Anwendung. Dieser Reaktionsmix enthält eine Taq DNA-Polymerase, den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I, Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, eine Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) sowie Stabilisatoren. In Tabelle 11 sind die Komponenten des für die *Real-Time* PCR benötigten Reaktionsansatzes aufgeführt. Die verwendeten Primer und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 3, Seite 21 aufgeführt.

**Tabelle 11:** Zusammensetzung des *Real-Time-PCR-Reaktionsansatzes*

<b><i>Real-Time-PCR-Reaktionsansatz (1x)</i></b>	
Aqua bidest	9,0 µl
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	12,5 µl
Sense-Primer (10 pmol)	1,0 µl
Antisense-Primer (10 pmol)	1,0 µl
ROX Reference Dye (1:100 in Aqua bidest verdünnt)	0,5 µl

Als NTC wurde Aqua bidest eingesetzt. Zu je 1 µl NTC, Plasmid-Standard oder cDNA wurden 24 µl des Reaktionsansatzes pipettiert. Die Vervielfältigung der cDNA erfolgte im Thermocycler Mx3000P (Stratagene), wobei die zugehörige Software Mx3000P durch Messen der Stärke des Fluoreszenzsignals nach jedem Zyklus eine Amplifikationskurve erstellte. Die Analyse der Plasmidstandards mit bekannter Molekülzahl ermöglichte dem Programm eine exakte Berechnung der Anzahl an DNA-Kopien in jeder Probe.

## **2.5 Herstellung von Plasmidstandards für die quantitative PCR**

### **2.5.1 Elektrophorese und Gelextraktion**

Zur Isolation eines reinen PCR-Produkts kam das peqGOLD Gel Extraction Kit (peQLab) zur Anwendung. Nach Ablauf einer PCR wurden die gewünschten DNA-Fragmente, welche durch das im Agarosegel befindliche GelRed™ (Biotium) unter UV-

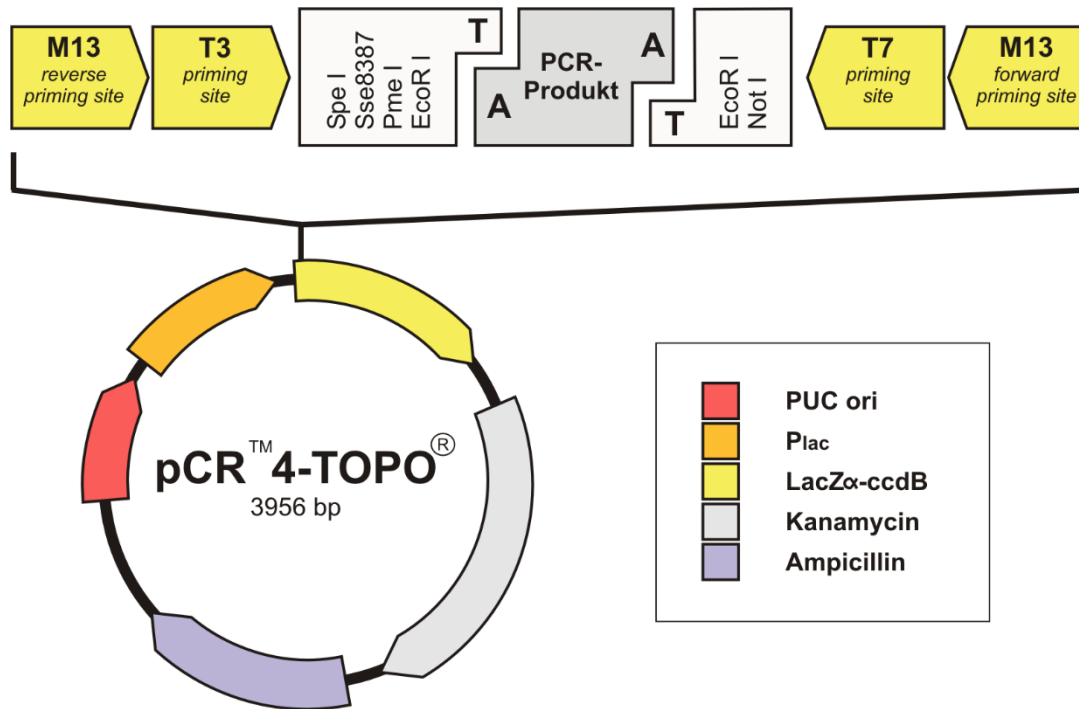
Durchleuchtung sichtbar wurden, mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten. Als Größenreferenz diente auch hier die DNA-Leiter 100 bp DNA Ladder N2321G (New England Biolabs). Nach Überführen in ein Reaktionsgefäß und Abwiegen erfolgte die Zugabe des mitgelieferten Bindepuffers im Verhältnis 1 ml / 1g. Das Gel löste sich durch Inkubation bei 60°C für 7 Minuten, wobei das Reaktionsgefäß alle 2-3 Minuten invertiert wurde. Die vollständig gelöste Agarose wurde nun titriert mit Natriumacetat versetzt, bis ein Farbumschlag von rot-orange zu hell-gelb einsetzte. Anschließend wurde das Gemisch in eine Säule (maximal 750 µl pro Durchgang) überführt und eine Minute bei 10.000 U/min zentrifugiert, wenn nötig wurde dieser Schritt wiederholt. Danach wurde die Säule mit 600 µl CG-Puffer gewaschen. Das Trocknen der Säule erfolgte durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (1 Minute, 10.000 U/min). Das isolierte PCR-Produkt wurde nun in 25 µl, auf 60°C erwärmtes Aqua bidest gelöst. Anschließend wurde das Fragment direkt zur Klonierungsreaktion weiterverwendet.

### 2.5.2 Klonierungsreaktion

Das Einbringen der gewonnenen PCR-Produkte in einen geeigneten Vektor erfolgte mit Hilfe des TOPO® TA Cloning® Kits (Invitrogen). Um das gewonnene PCR-Fragment in den Vektor pCR™4-TOPO® (Vektorkarte: siehe Abbildung 5) einzubauen, wurde der folgende Ansatz (Tabelle 12) gemischt und bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert. Danach wurde das Reaktionsgemisch bis zur Transformation auf Eis zwischengelagert.

**Tabelle 12:** Komponenten der Klonierungsreaktion

Klonierungsreaktion: Ligationsansatz	
frisches PCR-Produkt	2,0 µl
Salzlösung (1:4 mit Aqua bidest verdünnt)	0,5 µl
Vektor pCR™4-TOPO®	0,5 µl



**Abbildung 5:** Vektorkarte pCR<sup>TM</sup>4-TOPO<sup>®</sup> (modifiziert nach der Anleitung TOPO<sup>®</sup>TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing, Invitrogen )

### 2.5.3 Transformation

Zunächst wurden die zur Transformation benötigten, elektrokompenten *E.coli* TOP10 auf Eis aufgetaut. Ein Gemisch aus 20 µl dieser Zellen sowie 1 µl Ligationsansatz wurde in eine geeignete, vorgekühlte Küvette (BioRad) gegeben. Die Elektroporation erfolgte über einen Impuls mit 1,85 kV bei 200 Ω und 25 µF, wodurch die Aufnahme des konstruierten Plasmids in einen Teil der Bakterienzellen ausgelöst wurde. Sofort nach Gabe des elektrischen Impulses wurden die Zellen in 250 µl LB-Medium suspendiert und in einem Reaktionsgefäß für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte das Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agarplatten, welche als Selektionsantibiotikum Ampicillin oder Kanamycin (1:1.000) enthielten, sowie die Inkubation bei 37°C über Nacht. Die LB-Agarplatten wurden vor dem Aufbringen der Bakterien mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D- Galactopyranoside (X-Gal, AppliChem) nach Herstellerangaben präpariert. Mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion war es am nächsten Tag möglich, die Bakterienkolonien, in welchen eine Aufnahme des konstruierten Plasmids erfolgt war, zu identifizieren.

#### 2.5.4 Plasmidpräparation (Mini-Präparation)

Die Plasmidpräparation (Mini-Präparation) erfolgte unter Verwendung des *E.Z.N.A.*<sup>®</sup> *Plasmid Miniprep II* – Kits (peQLab) nach Herstellerangaben. Am Vortag der eigentlichen Präparation wurden 4-5 ml LB-Medium mit Selektionsmedium (Ampicillin oder Kanamycin, 1:1.000) versetzt und mit einer Bakterienkolonie, welche über Nacht auf den LB-Agarplatten gewachsen war, beimpft. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37°C für weitere 12 bis 16 Stunden. Dem Zentrifugieren bei 5.000 U/min für 10 Minuten folgte das Verwerfen des Überstands und die Resuspension des Bakterienpellets in 250 µl Lösung I / RNase A. Nach Überführen in ein Zentrifugenröhrchen, Zugabe von 250 µl Lösung II sowie vorsichtigem 5-maligem Invertieren erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, bis ein klares Lysat entstanden war. Diesem wurden 350 µl Lösung III zugesetzt. Durch weiteres Invertieren bildete sich ein flockiges Präzipitat aus. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 10.000 U/min zur Abtrennung der in den Ausflockungen befindlichen Zelltrümmer und Proteine wurden 800 µl des Überstandes in eine *HiBind*<sup>®</sup>-*Miniprep*-Zentrifugensäule überführt. Der Überstand passierte die Silikamembran der Säule durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 10.000 U/min für eine Minute. Der Durchfluss wurde verworfen. Die nun auf der Säulenmembran konzentrierte Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 750 µl DNA-Waschpuffer (mit Ethanol komplettiert) und anschließender Zentrifugation (1 Minute, 10.000 U/min) gereinigt. Ein weiteres Zentrifugieren bei Maximalgeschwindigkeit für eine Minute diente dem Trocknen der DNA, welche anschließend in 40 µl 60°C warmen Aqua bidest gelöst wurde.

#### 2.5.5 Restriktionsanalysen

Um die Integration des gewünschten PCR-Produkts in den Vektor zu überprüfen, wurde zunächst ein Restriktionsansatz bestehend aus Plasmid-DNA, Restriktionsenzym, Puffer sowie Aqua bidest hergestellt (Tabelle 13).

**Tabelle 13:** Komponenten des Restriktionsansatzes

<b>Restriktionsansatz (1x)</b>	
Plasmid-DNA	10,0 µl
Restriktionsenzym EcoR1	0,2 µl
Puffer	2,0 µl
Aqua bidest	7,8 µl

Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz auf ein 1% Agarosegel aufgetragen, welches mit GelRed<sup>TM</sup> (Biotium, 1:100.000) versetzt war. Als Negativkontrolle dienten 10 µl Plasmid-DNA ohne Enzymzusatz, der Abgleich der Fragmentgröße erfolgte mit Hilfe der DNA-Leiter 100 bp DNA Ladder N2321G (New England Biolabs). Nachdem die DNA-Fragmente 30 Minuten bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt waren, folgte die Dokumentation des Gels durch das Detektionssystem Fusion Fx7 (peQLab) mit Hilfe der FUSION-CAPT<sup>TM</sup> Software (Vilber Lourmat) sowie die Auswertung durch das Programm Quantity One<sup>®</sup> (BioRad) und das Statistikprogramm Sigma Stat (Systat Software Inc.).

### 2.5.6 Sequenzierung

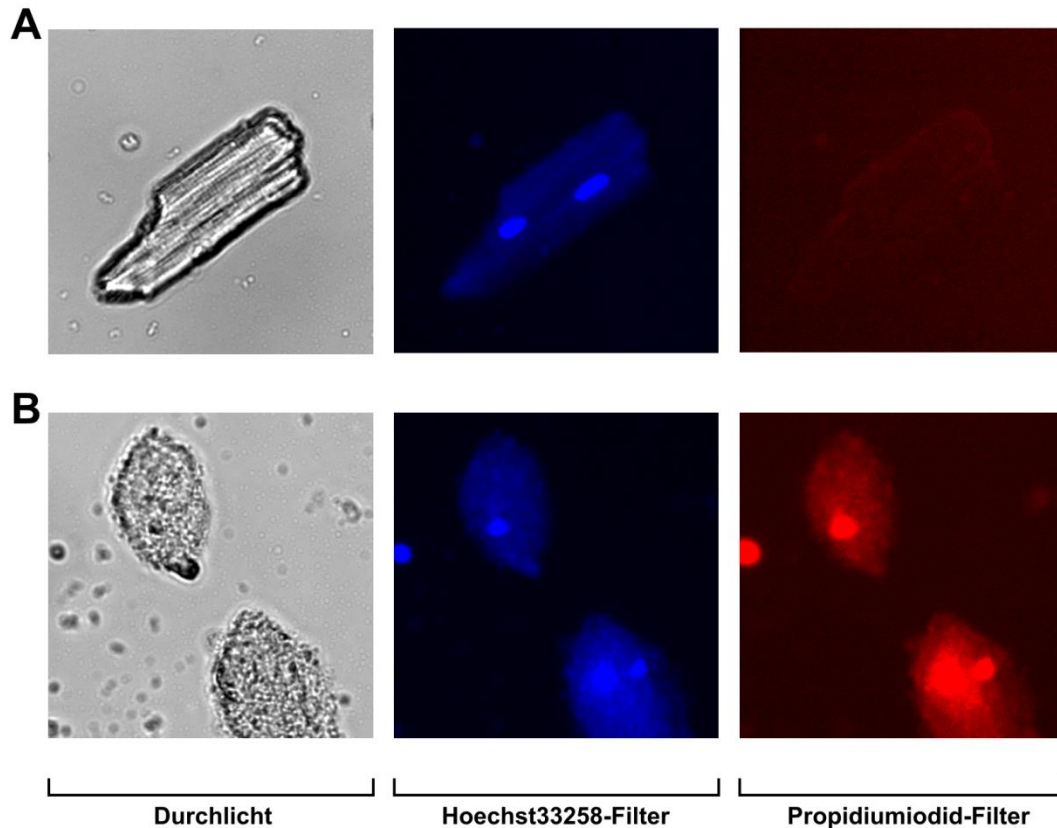
Konnten mittels Restriktionsanalyse Klone mit dem gewünschten Plasmid identifiziert werden, erfolgte die Sequenzierung der Plasmid-DNA durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz). Dazu wurde ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einem Barcode-Aufkleber versehen, welcher später die Zuordnung der Sequenzanalyse zu den untersuchten Proben ermöglichte. In das Reaktionsgefäß wurden je 5 µl Plasmid-DNA (80-100 ng/µl) sowie Sequenzierprimer (5 pmol/µl) pipettiert und die Probe anschließend per Post an das Sequenzierlabor gesendet. Die ermittelten Sequenzen ermöglichten über DNA-Datenbanken (NCBI) den Abgleich mit bekannten Zielsequenzen.

### 2.5.7 Plasmidpräparation (Midi-Präparation)

Im nächsten Schritt erfolgte die Kultur der Bakterienklone, welche das gewünschte Insert ohne Mutationen enthielten, für eine größere Plasmidpräparation (Midi-Präparation). Hierzu wurde der gewünschte Klon in 200 ml LB-Medium, das mit Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin, 1:1.000) versetzt war, überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Für die folgenden Präparationsschritte kam das Pure Link™ Hi Pure Plasmid Midprep Kit (Invitrogen) gemäß den Herstellerangaben zum Einsatz. Nach Aufnahme in ein angemessenes Volumen an Aqua bidest wurde die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA mittels Photometer (Nano Drop® ND-1000, peQLab) ermittelt und die Plasmid-DNA bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die Herstellung einer Plasmid-Standardreihe für die quantitative PCR erfolgte durch Verdünnung der Plasmid-DNA mit Aqua bidest im Verhältnis von 1:10 – 1:10<sup>9</sup>.

## 2.6 Quantifizierung der Zellvitalität

Um sowohl den Anteil stäbchenförmiger, als auch apoptotischer und nekrotischer Kardiomyozyten nach Herbeiführen von oxidativem Stress zu bestimmen, wurden die Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst 33258 und Propidiumiodid (PI) inkubiert. Hoechst 33258 bindet mit hoher Affinität an DNA und ist in der Lage, die intakte Zellmembran zu passieren. Angeregt von Licht mit einer Wellenlänge von 340-360 nm zeigt der DNA-Farbstoff eine intensiv blaue Fluoreszenz. PI dagegen ist nicht membrangängig, bindet aber in Zellen mit geschädigter Zellmembran mit ebenfalls hoher Affinität an DNA. Die für diesen Farbstoff typische rote Fluoreszenz zeigt sich nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 510-550 nm [75]. Ungeschädigte, vitale Kardiomyozyten zeichnen sich zum einen durch die typische stäbchenförmige Morphologie, zum anderen durch die lediglich schwach blaue Fluoreszenz der länglichen Zellkerne aus. Nekrotische Zellen erscheinen abgerundet, unterscheiden sich jedoch durch zusätzliche rote Fluoreszenz der Kernfragmente von apoptotischen Kardiomyozyten (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Ermittlung der Zellvitalität mittels Hoechst33258 und PI: (A) Vitaler, stäbchenförmiger Kardiomyozyt. Unter Einsatz von Hoechst33258-Filtern erscheinen die Zellkerne länglich. Propidiumiodid ist nicht in der Lage, die intakte Zellmembran zu durchdringen. (B) Nekrotische, abgerundete Kardiomyozyten mit abgerundeten Zellkernen und deutlich erkennbarer roter Fluoreszenz nach Gabe von Propidiumiodid. Die abgebildeten Aufnahmen wurden nachträglich eingefärbt und dienen der Veranschaulichung des Fluoreszenzverhaltens.

In dieser Arbeit wurden die isolierten Zellen nach stattgehabter Stimulation nach Versuchsprotokoll für 10 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur mit Hoechst33258 (5µg/ml) und PI (1µg/ml) Zellkulturmedium inkubiert. Durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturschalen wurden die Farbstoffe gleichmäßig im Medium verteilt. Anschließend wurden in jeder Schale fünf willkürlich ausgewählte Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung analysiert. Dazu wurde zunächst bei Durchlicht die Gesamtzahl der Myozyten bestimmt, dann unter Verwendung spezieller Filter bei entsprechender Wellenlänge der Anteil apoptotischer und nekrotischer Kardiomyozyten ermittelt. Von jeder Behandlungsgruppe wurden auf diese Weise insgesamt 15 Gesichtsfelder in drei unterschiedlichen Schalen analysiert. Der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen wurde als prozentualer Teil der Gesamtmyozytenzahl angegeben.

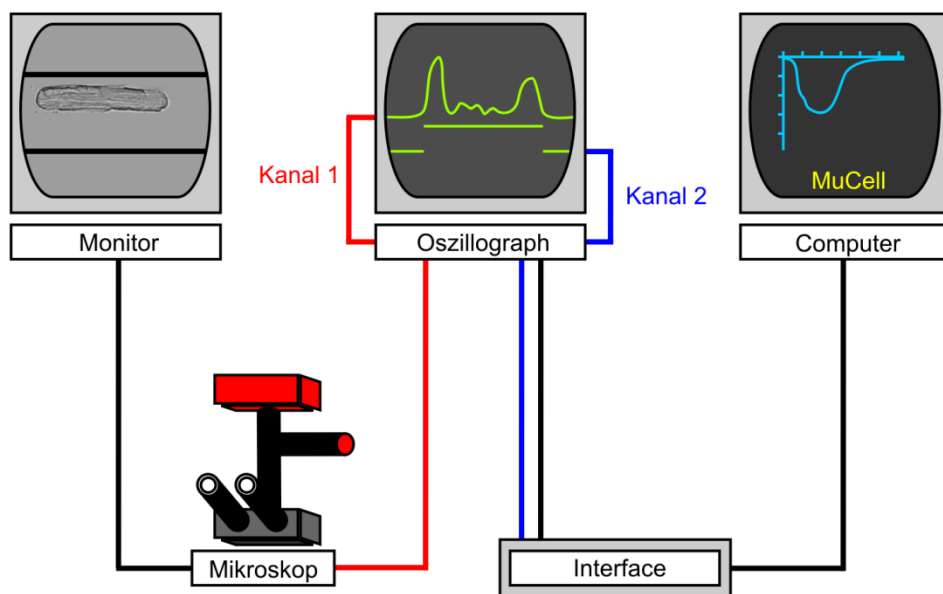


## 2.7 Messung der kontraktile Antwort im elektrischen Feld

Die Messung der kontraktile Antwort adulter Kardiomyozyten im elektrischen Feld erfolgte wie von Piper et al. beschrieben [97]. Die hierfür benötigte Apparatur bestand aus dem Mikroskop TMS-F Typ 120 (Nikon GmbH, Düsseldorf), an welches zwei Kameras angeschlossen waren, dem Interface INT4 (Scientific Instruments GmbH, Heidelberg), dem Oszillograph OS-9020A (GoldStar Co., Korea), einem Monitor (Philips) sowie einem Computer, der ebenfalls an einen Bildschirm angeschlossen war (Abbildung 7). Der Objektisch des Mikroskops erlaubte über eine passende Aussparung das Einsetzen einer Kulturschale in den Strahlengang. Während eine der beiden an das Mikroskop angeschlossenen Kameras zur Darstellung des betrachteten Bildes auf einem Bildschirm diente, handelte es sich bei der zweiten Kamera um eine Zeilenkamera. Diese ermöglichte die Erfassung der Zellgrenzen des betrachteten Kardiomyozyten anhand der Registrierung verschiedener Helligkeitsstufen. Das Bild der Zeilenkamera wurde in elektrische Signale umgewandelt und konnte über das Interface auf dem Oszillographen dargestellt werden.

Zu Beginn der Messung wurde die zu untersuchende Kulturschale in die Vertiefung des Objektisches eingesetzt. Ein modifizierter Schalendeckel mit zwei parallel verlaufenden  $\text{AgCl}_2$ -Drähten, welche in das Zellkulturmedium der untersuchten Schale eintauchten und dort die Anode und die Kathode bildeten, ermöglichte den Stromfluss durch das Medium. Die elektrische Stimulation bestand aus biphasischen, 0,5 Millisekunden dauernden Stromstößen, welche durch zwei entgegengesetzte Rechteckspannungen von je 60 V ausgelöst wurden. Über das Mikroskop wurde die Kulturschale zunächst bei 4-facher Vergrößerung durchmustert und anschließend ein geeigneter, stäbchenförmiger Kardiomyozyt, der regelmäßig im elektrischen Feld kontrahierte, bei 40-facher Vergrößerung mittig im Okularbild eingestellt. Über einen seitlich des Mikroskops angebrachten Drehschalter wurde der Strahlengang anschließend insofern geändert, dass die Bildinformation nicht mehr dem Okular, sondern den beiden Kameras zugeleitet wurde, wodurch die eingestellte Zelle auf dem Bildschirm sichtbar wurde. Um die kontraktile Antwort des Kardiomyozyten messen zu können, musste die Zeilenkamera durch Drehen oder durch Bewegung des Objektisches so ausgerichtet werden, dass die Längsachse der Zelle parallel zur Längsrichtung der Kamerazeile lag. Der Erfassungsbereich der Zeilenkamera war dabei auf dem Bildschirm mit zwei parallel

horizontal verlaufenden Linien gekennzeichnet. Das elektrische Signal der Zeilenkamera wurde nun über den ersten Kanal auf dem Monitor des Zweikanaloszillographen sichtbar, wobei die Ablenkzeit des Horizontalverstärkers auf 0,1 ms/cm festgelegt und der Vertikalverstärker auf 5 V/div eingestellt war. Durch interne Triggerung konnte ein Standbild erzeugt werden, wobei Helligkeiten unterschiedlicher Intensität als mehr oder weniger starke Auslenkung der Y-Achse auf dem Monitor des Oszillographen dargestellt wurden. Da die Zellgrenze einen großen Helligkeitsunterschied zum Hintergrund aufwies, erschienen bei korrekter Ausrichtung der Zelle auf dem Monitor des Oszillographen zwei Amplitudenanstiege, welche die beiden Enden des Kardiomyozyten markierten. Dem zweiten Kanal lag eine feste, durch das Interface getriggerte Spannung an. Diese wurde, sobald die Spannung des ersten Kanals einen Triggerwert überschritt, vom Oszillograph als Sprung der Horizontalen des zweiten Kanals auf dem Bildschirm visualisiert. Zur korrekten Messung der gewünschten Kontraktionsparameter musste der Triggerwert mit Hilfe eines ebenfalls auf dem Monitor des Oszillographen sichtbaren Triggermarkers über die Bedienelemente des Oszillographen so eingestellt werden, dass die parallel zur Nulllinie verlaufende Horizontale der Interfacespannung bezogen auf ihre Länge die durch den ersten Kanal visualisierten Zellgrenzen wiedergab (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Messung der kontraktiven Antwort isolierter Kardiomyozyten der Ratte. Der Bildschirm des Oszillographen zeigt das Resultat einer korrekten Anpassung des Triggermarkers: Die parallel zur Nulllinie verlaufende Horizontale (registrierte Spannung des Interface), gibt die über den ersten Kanal visualisierten Zellgrenzen wieder, welche durch die Zeilenkamera (roter Aufbau auf dem Mikroskop) erfasst wurden.

Sowohl a) das Vorhandensein, b) die Länge dieser Horizontalen, als auch c) das Ausmaß ihrer Verkürzung wurden über das Interface an einen Computer weitergeleitet. Das Programm MuCell der Firma Scientific Instruments GmbH (Heidelberg) errechnete aus diesen Informationen unter anderem die maximale Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit in  $\mu\text{m/s}$ , sowie prozentuale Verkürzung des untersuchten Kardiomyozyten (dL/L). Die Erfassung sämtlicher Kontraktionsparameter fand bei Raumtemperatur statt. Dabei erfolgte die Zellverkürzung lastfrei im Zellkulturmedium. Die isolierten Zellen wurden entweder mit Adiponektin ( $4\mu\text{g/ml}$ ) oder CTRP 1, 2, 7 und 9 ( $4\mu\text{g/ml}$ ) über Zeiträume von 5 Minuten oder 24 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle diente Isoproterenol in einer Konzentration von 10 nM, welches stets 5 Minuten vor Beginn der Messung in die entsprechenden Zellkulturschalen gegeben wurde. Von jedem Kardiomyozyt wurde die kontraktile Antwort zunächst durch Erfassung von vier Kontraktionen bei einer Frequenz von 1 Hz gemessen. Danach wurde die Stimulationsfrequenz auf 0,5 Hz gesenkt. Nachdem sich die Zelle an die neue Frequenz adaptiert hatte, erfolgte analog zur vorherigen Messung die Aufzeichnung von vier weiteren Kontraktionen; Gleiches bei einer Frequenz von 2 Hz. Pro Kulturschale wurden auf diese Weise fünf Zellen vermessen.

## 2.8 Statistische Auswertung

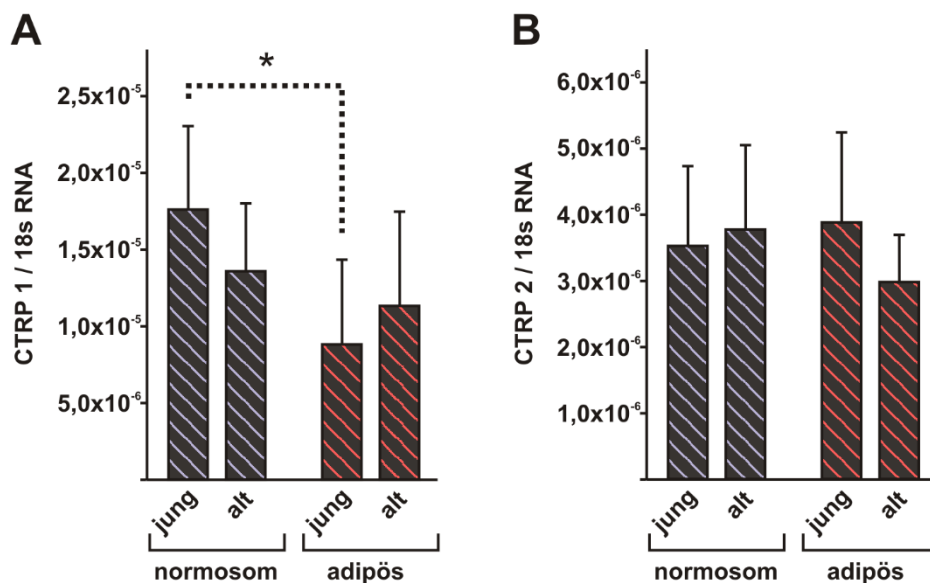
Die statistische Auswertung der durchgeführten Experimente erfolgte durch die Berechnung von Mittelwerten + Standardabweichung (*standard deviation*, SD) mit Hilfe des Programms Sigma Stat Version 3.5 (Systat Software Inc.). Sämtliche Signifikanzanalysen erfolgten durch Anwendung des t-Tests bzw. des One Way ANOVA-Tests über das Programm Sigma Stat Version 3.5 (Systat Software Inc.). Dabei wurde ein p-Wert  $< 0,05$  als signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expressionsanalysen an humanen Herzproben

##### 3.1.1 Expression von CTRP 1, 2, 7 und 9 im rechten Vorhof normosomer und adipöser Individuen verschiedener Altersgruppen

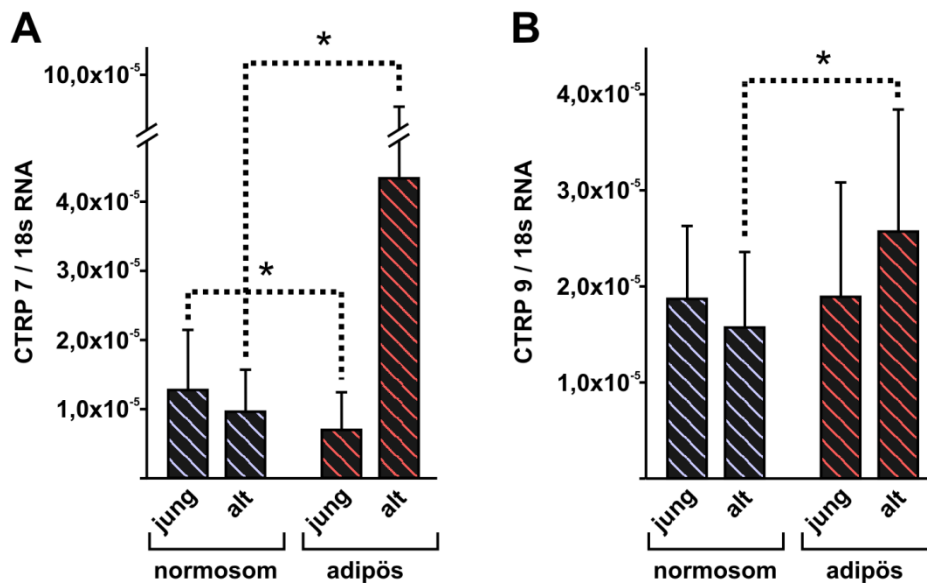
Aus der Literatur ist bekannt, dass der Plasmaspiegel von Adiponektin, welches ausschließlich von Adipozyten gebildet wird, bei Übergewichtigen signifikant verringert ist [4]. Zugleich konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten CTRPs in Herzen adulter Ratten exprimiert werden (Daten nicht gezeigt). Daher sollte zunächst die altersabhängige Expression von CTRP 1, 2, 7 und 9 im rechten Vorhof (RA) von normosomen (BMI 18-25 kg/m<sup>2</sup>) sowie adipösen (BMI 30-35 kg/m<sup>2</sup>) Patienten verglichen werden. Die aus dem RA gewonnene RNA wurde von der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bereitgestellt und diente als Ausgangsprodukt der Synthese von cDNA, welche einer quantitativen Analyse mittels *Real-Time* PCR unterzogen wurde.



**Abbildung 8:** Expressionsanalysen von CTRP 1 und 2 im RA normosomer und adipöser Individuen unterschiedlicher Altersgruppen mittels quantitativer PCR: Expression von (A) CTRP 1 und (B) CTRP 2.  $n_{(jung\ normosom)} = 14$ ,  $n_{(jung\ adipös)} = 19$ ,  $n_{(alt\ normosom)} = 17$ ,  $n_{(alt\ adipös)} = 18$ ; \* =  $p < 0,05$

Die Analyse von CTRP 1 zeigte einen signifikanten Abfall der RNA-Expression in jungen, adipösen Patienten im Vergleich zu normosomen Individuen derselben Altersgruppe. Eine ähnliche Tendenz konnte auch im Vergleich alter, adipöser Patienten zu Normosomen diesen Alters festgestellt werden, hier waren die Unterschiede jedoch

nicht signifikant. Es konnte zudem kein Unterschied zwischen den jeweiligen Alterskohorten normal- oder übergewichtiger Individuen gezeigt werden (Abbildung 8A). In Bezug auf CTRP 2 ließen sich bis auf eine tendenzielle Reduktion in den rechten Vorhöfen alter adipöser Patienten im Vergleich zu jungen Adipösen keine signifikanten Expressionsunterschiede feststellen (Abbildung 8B).



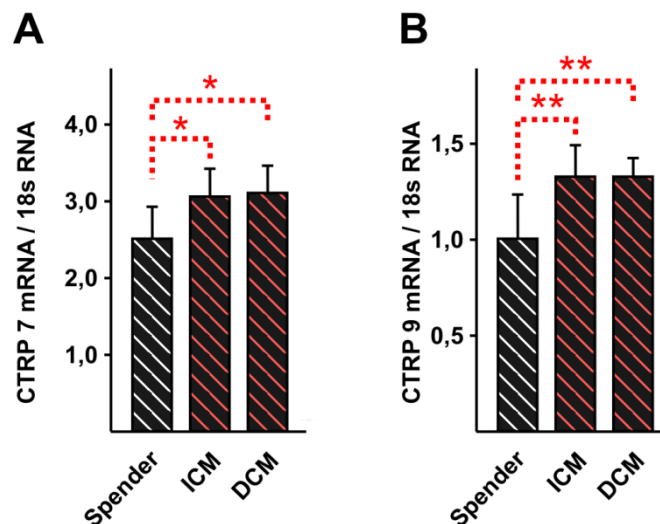
**Abbildung 9:** Expressionsanalysen von CTRP 7 und 9 im RA normosomer und adipöser Individuen unterschiedlicher Altersgruppen mittels quantitativer PCR: Expression von (A) CTRP 7 und (B) CTRP 9;  $n_{(jung\ normosom)} = 14$ ,  $n_{(jung\ adipös)} = 19$ ,  $n_{(alt\ normosom)} = 17$ ,  $n_{(alt\ adipös)} = 18$ ; \* =  $p < 0,05$

Im Rahmen der Expressionsanalyse von CTRP 7 zeigte sich bei jungen Patienten eine geringere Expression im RA Übergewichtiger im Vergleich zur normosomen Kohorte, wohingegen eine signifikant gesteigerte Expression bei Übergewichtigen höheren Alters im Vergleich zur Gruppe der alten Normalgewichtigen beobachtet werden konnte (Abbildung 9A). Auch CTRP 9 war signifikant stärker in den rechten Vorhöfen älterer Übergewichtiger im Vergleich zu Normosomen höheren Alters exprimiert (Abbildung 9B), während kein Unterschied in der Expression in den jungen Patienten nachgewiesen werden konnte.

### 3.1.2 Expression von CTRP 7 und 9 im linken Ventrikel von Spendern sowie Patienten mit ischämischer- oder dilatativer Kardiomyopathie

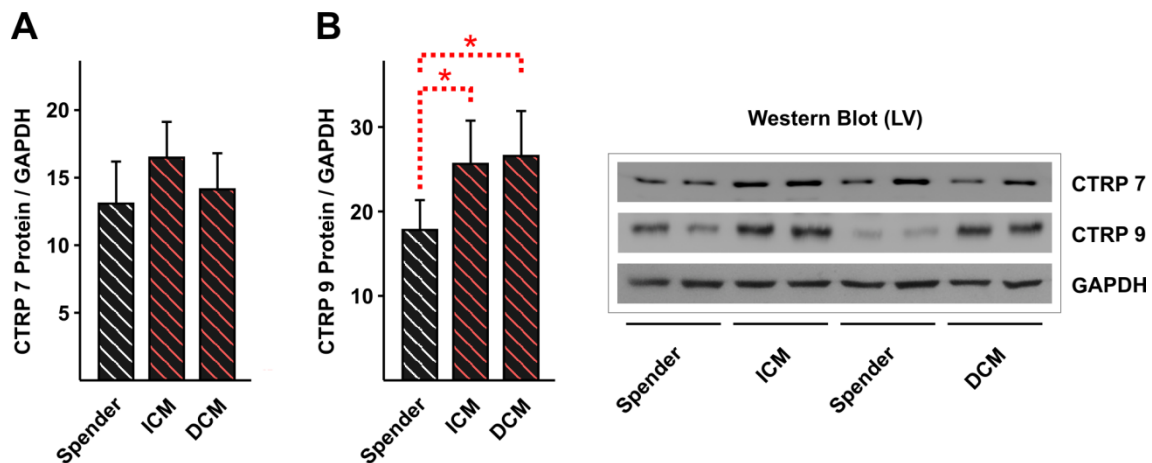
In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Expression von CTRP 7 und CTRP 9 im linken Ventrikel (LV) gesunder Spender sowie von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz (DCM = dilatative Kardiomyopathie und ICM = ischämische Kardiomyopathie) auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Die verwendeten Proben entstammten dem Transplantationsprogramm der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Bei den LV-Proben handelt es sich um explantierte Herzen von Patienten, die sich aufgrund einer terminalen Herzinsuffizienz einer Herztransplantation unterziehen mussten. Die Spenderherzen hingegen konnten aus technischen Gründen wie einem *Mismatch* zwischen Spender- und Empfängerherzen in der Größe oder einer intraoperativ entdeckten koronaren Herzkrankheit der Spenderherzen nicht für die Implantation verwendet werden.

Auf transkriptioneller Ebene konnte eine signifikant gegenüber den Spenderherzen erhöhte Expression von CTRP 7 und 9 sowohl in den LV-Proben der ICM-, als auch der DCM-Patienten festgestellt werden (Abbildung 10A und B).



**Abbildung 10:** Expressionsanalysen von CTRP 7 und 9 im LV von Spendern, Patienten mit ICM oder DCM: semiquantitative PCR zum Nachweis von (A) CTRP 7 und (B) CTRP 9,  $n = 10$  pro Gruppe. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$

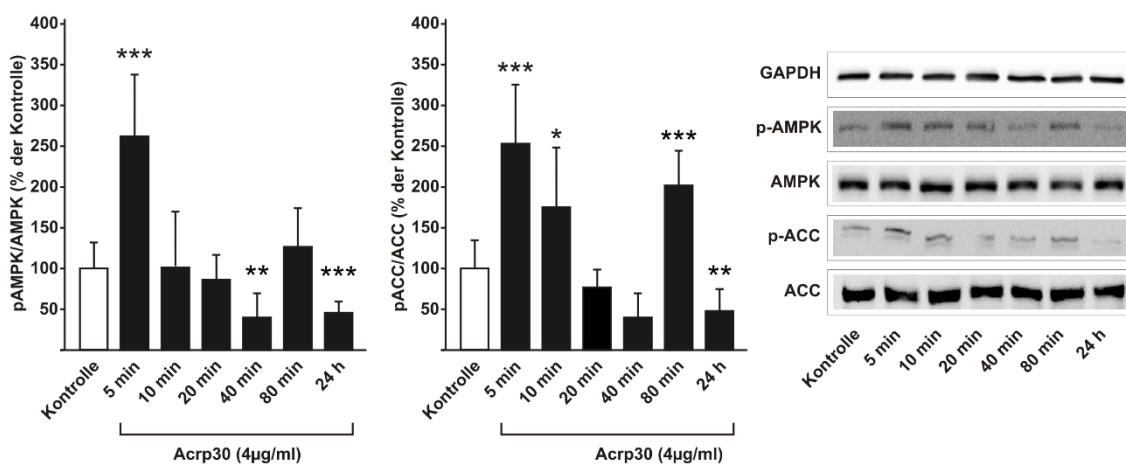
Dieser Anstieg konnte für CTRP 9 in den ICM- und DCM-Proben auf Proteinebene bestätigt werden. Auch bei CTRP 7 zeigte sich eine tendenziell erhöhte Proteinexpression im LV von ICM-Herzen, allerdings waren hier die Werte im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert (Abbildung 11A und B).



**Abbildung 11:** Expressionsanalysen von CTRP 7 und 9 im LV von Spendern, Patienten mit ICM oder DCM: Western-Blot-Nachweis von (A) CTRP 7 und (B) CTRP 9,  $n = 10$  pro Gruppe; \* =  $p < 0,05$

### 3.2 Einfluss von Adiponektin auf die Phosphorylierung der AMPK und der ACC in adulten Rattenkardiomyozyten

Die Aktivierung der AMP-abhängigen Proteinkinase (AMPK) mit resultierender Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) stellt eine wichtige, unter anderem durch Adiponektin induzierte Signalkaskade dar. Daher sollte zunächst die Phosphorylierung der AMPK an Position Thr172 sowie der ACC an Position Ser79 auf Proteinebene nach verschiedenen Inkubationszeiten in adulten Kardiomyozyten der Ratte untersucht werden. Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der isolierten Kardiomyozyten mit Adiponektin in einer Konzentration von 4 µg/ml zu einer signifikant erhöhten AMPK-Phosphorylierung nach 5 Minuten sowie zu einer signifikant reduzierter Aktivierung des Enzyms nach 40 Minuten und 24 Stunden führte. Eine ähnliche Tendenz war auch in Bezug auf die ACC-Phosphorylierung erkennbar, wobei es zu einem signifikanten Anstieg nach 5 und nach 10 Minuten kam. Einer nach 20-40 minütiger Inkubation tendenziell verminderten Phosphorylierung folgte ein erneuter Anstieg auf das Doppelte der Kontrolle gefolgt von einem signifikanten Abfall auf unter 50% nach 24 Stunden (Abbildung 12).



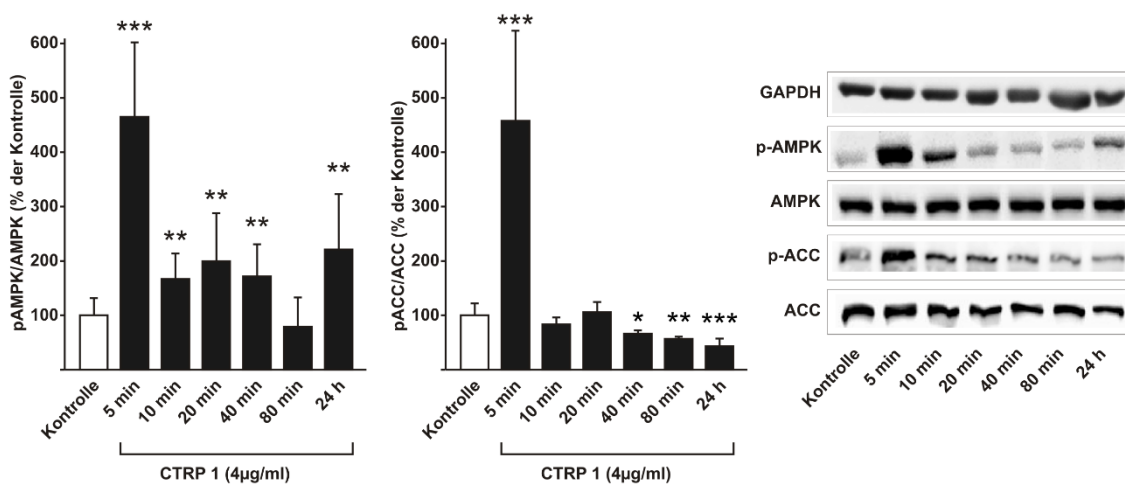
**Abbildung 12:** Western-Blot-Nachweis der AMPK- und ACC-Phosphorylierung in Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit Adiponektin. Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar.  $n = 3$  pro Gruppe, 3 unabhängige Experimente. Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet; \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$



### 3.3 Einfluss von CTRP 1, 2, 7 und 9 auf die Phosphorylierung der AMPK und der ACC in adulten Rattenkardiomyozyten

Nachdem die zeitabhängige Phosphorylierung der AMPK mit konsekutiver Inaktivierung der ACC durch Adiponektin gezeigt werden konnte, wurde der Einfluss von CTRP 1, 2, 7 und 9 auf diese Signalkaskade in einer nachfolgenden Versuchsreihe mittels Western-Blot analysiert. Dabei erfolgte die Stimulation der isolierten Kardiomyozyten mit je 4 µg/ml des entsprechenden CTRPs.

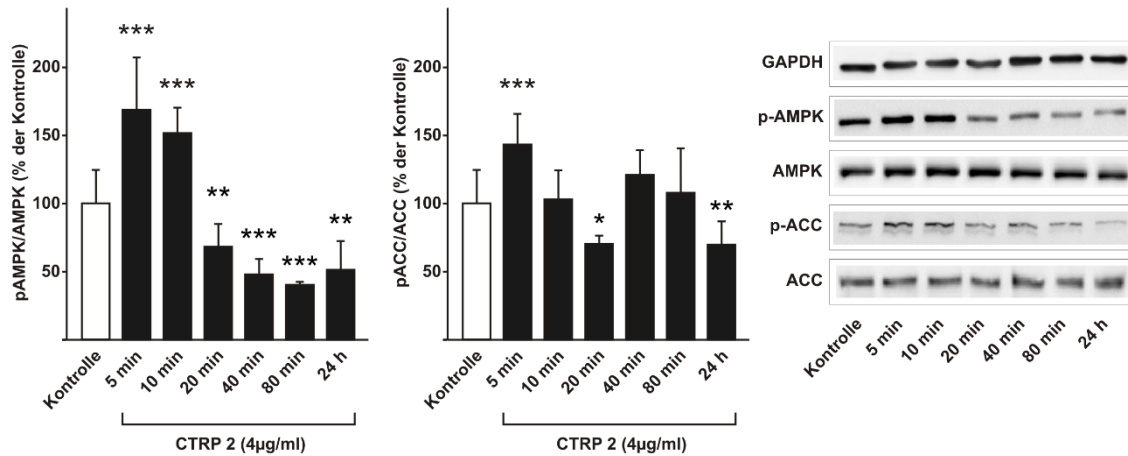
Die Behandlung mit CTRP 1 (Abbildung 13) resultierte in einer signifikant gesteigerten Phosphorylierung der AMPK auf etwa das 4,5-fache der Kontrolle nach 5 Minuten sowie auf einem deutlich niedrigerem Niveau auch nach 10, 20 und 40 Minuten. Im Gegensatz zu den mit Adiponektin behandelten Kardiomyozyten kam es nach 24-stündiger CTRP 1-Behandlung zu einem Wiederanstieg der AMPK-Phosphorylierung auf mehr als das Doppelte der Kontrollwerte. Das Zeitprofil der ACC-Phosphorylierung ähnelte auch hier dem der AMPK-Aktivierung mit einem signifikanten Anstieg nach 5 Minuten, allerdings gefolgt von einer signifikanten Reduktion nach 40 und 80 Minuten sowie nach 24 Stunden.



**Abbildung 13:** Western-Blot-Nachweis der AMPK- und ACC-Phosphorylierung in Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit CTRP 1. Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar.  $n = 3$  pro Gruppe, 3 unabhängige Experimente. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

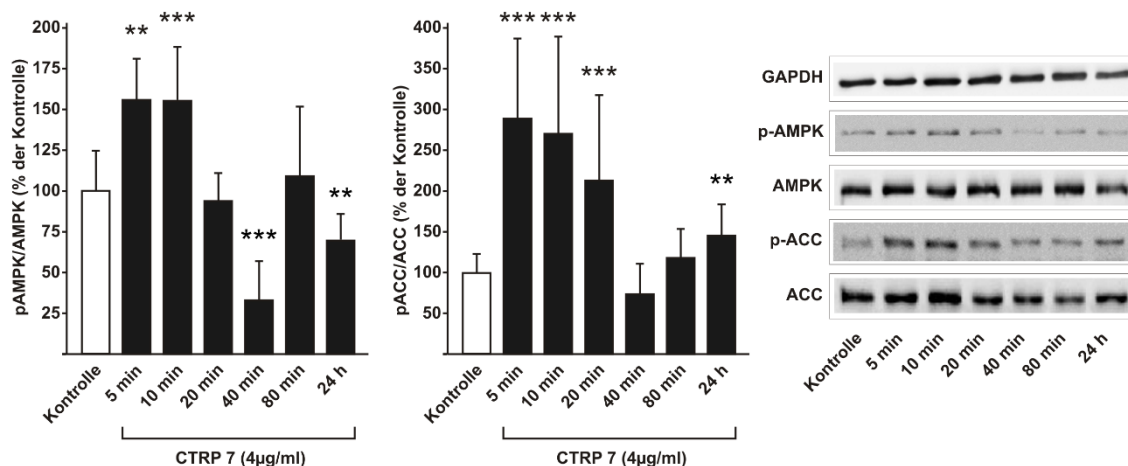
Abbildung 14 veranschaulicht den Phosphorylierungsstatus der AMPK und der ACC nach Gabe von 4 µg/ml CTRP 2. Der signifikanten Induktion der AMPK-Aktivierung nach 5 und 10 Minuten im Vergleich zur Kontrolle folgte ein ebenfalls signifikanter Abfall der Phosphorylierung nach 20, 40 und 80 Minuten sowie nach 24 Stunden. Auch

die ACC-Phosphorylierung war nach fünfminütiger Inkubation zunächst gesteigert sowie nach 20 Minuten und 24 Stunden signifikant reduziert.



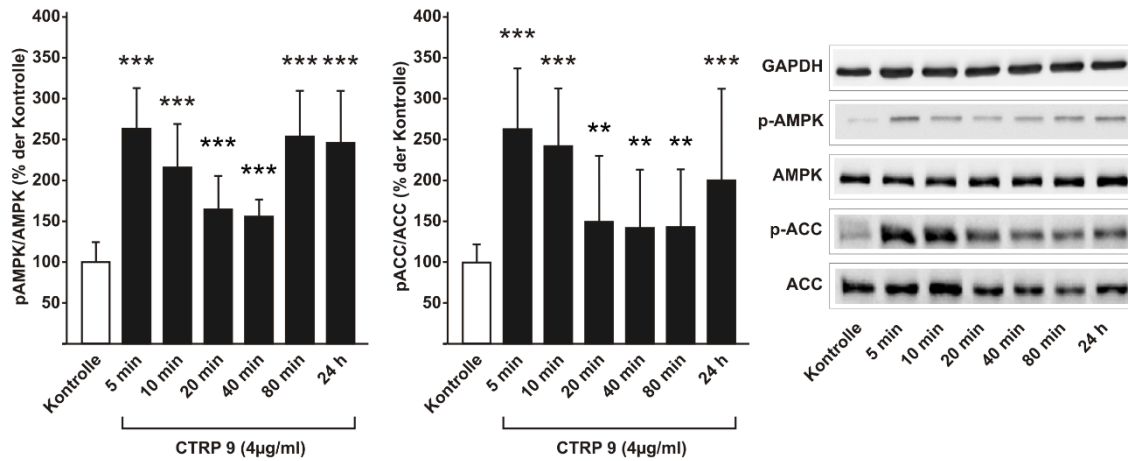
**Abbildung 14:** Western-Blot-Nachweis der AMPK- und ACC-Phosphorylierung in Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit CTRP 2. Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar.  $n = 3$  pro Gruppe, 3 unabhängige Experimente. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

CTRP 7 führte ebenfalls zu einer signifikant gesteigerten Phosphorylierung der AMPK nach 5 und 10 Minuten, gefolgt von einer signifikanten Reduktion nach 40 Minuten und 24 Stunden. Bezüglich der ACC zeigte sich eine gesteigerte Phosphorylierung nach 5, 10 und 20 Minuten sowie ein erneuter Anstieg nach 24 Stunden (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Western-Blot-Nachweis der AMPK- und ACC-Phosphorylierung in Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit CTRP 7 [4 µg/ml]. Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar.  $n = 3$  pro Gruppe, 3 unabhängige Experimente. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

Auch die Stimulation mit CTRP 9 führte zu einer signifikanten Zunahme der AMPK-Phosphorylierung über alle betrachteten Inkubationszeiten. Die ACC-Phosphorylierung ähnelte auch hier dem Zeitprofil der AMPK-Aktivierung mit ebenfalls durchgängig signifikanten Anstiegen in Bezug zur Kontrolle (Abbildung 16).

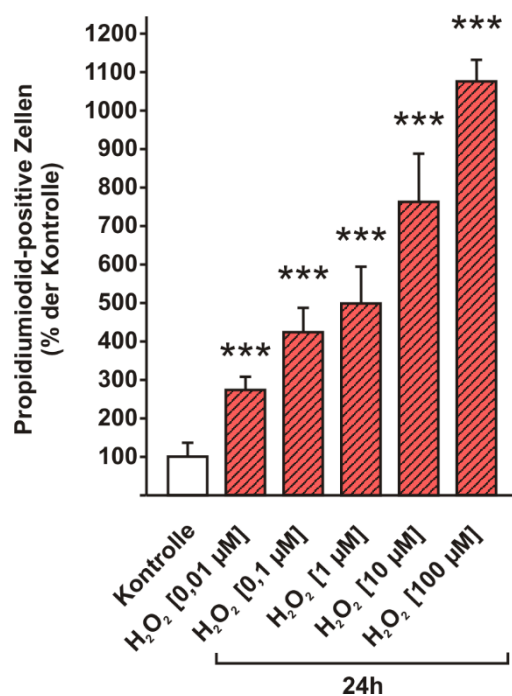


**Abbildung 16:** Western-Blot-Nachweis der AMPK- und ACC-Phosphorylierung in Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit CTRP 9 [4 µg/ml]. Werte stellen Mittelwerte + SD dar.  $n = 3$  pro Gruppe, 3 unabhängige Experimente. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

### 3.4 Einfluss von Adiponektin und von CTRP 1, 2, 7 und 9 auf die Reaktion isolierter Kardiomyozyten auf oxidativen Stress

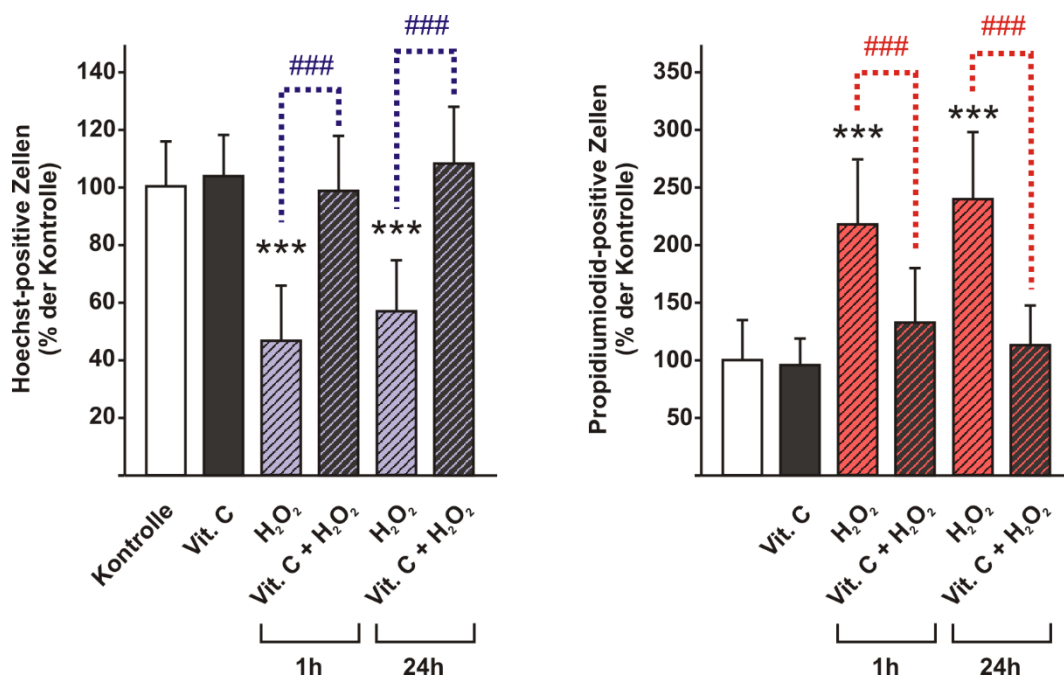
#### 3.4.1 Einfluss auf die Zellvitalität

Pathologien des kardiovaskulären Systems gehen meist mit einer vermehrten ROS-Bildung einher [49, 72]. Um die Auswirkung dieser reaktiven Sauerstoffspezies auf die Vitalität der isolierten Kardiomyozyten zu untersuchen, erfolgte in einer ersten Versuchsreihe die Quantifikation vitaler, nekrotischer sowie apoptotischer Zellen hinsichtlich zellmorphologischer Kriterien sowie der Anfärbbarkeit durch die DNA-Farbstoffe Hoechst33258 und Propidiumiodid (Hoechst-Assay). Die isolierten Kardiomyozyten wurden dazu mit Wasserstoffperoxid versetzt und/oder mit Adiponektin, CTRPs sowie AraA als AMPK-Inhibitor stimuliert. Zunächst wurde gezeigt, dass die Inkubation mit  $H_2O_2$  konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Steigerung des Anteils PI-positiver Zellen führt (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Nachweis nekrotischer, PI-positiver Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten  $H_2O_2$ -Konzentration: Zunahme PI-positiver Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit  $H_2O_2$  [0,001 bis 100 µM]. Werte stellen Mittelwerte + SD dar.  $n = 10$  pro Gruppe, mindestens 3 unabhängige Experimente. \*\*\* =  $p < 0,001$

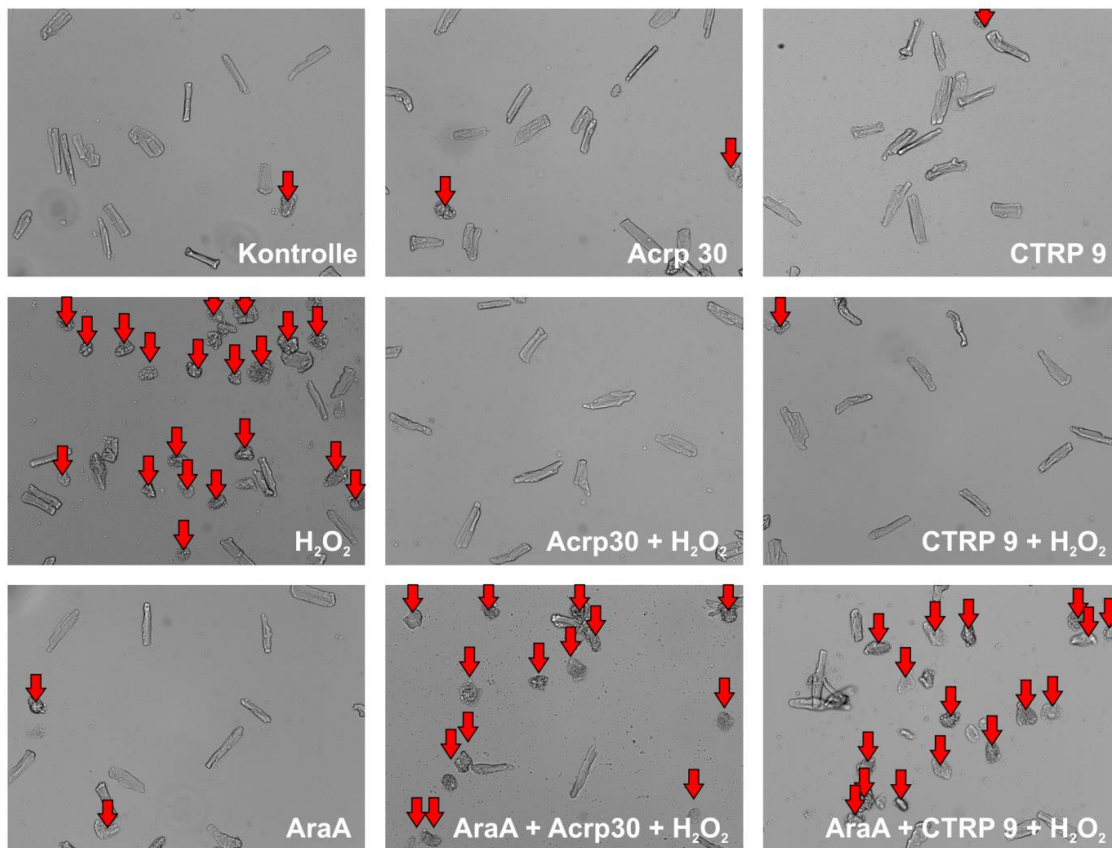
Im Vergleich von Kurz- (1 Stunde) und Langzeitinkubation (24 Stunden) mit 1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Stimulationszeiten. Sowohl nach einer, als auch nach 24 Stunden kam es zu einem starken Abfall der lebenden, stäbchenförmigen Zellen sowie zu einem ebenfalls signifikant gesteigerten Anteil PI-positiver Zellen auf mehr als das Doppelte der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 18). Um zu zeigen, dass Radikale für die abnehmende Vitalität der untersuchten Zellen nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gabe verantwortlich sind, erfolgte zudem in einigen Schalen die Präinkubation mit dem Antioxidans Ascorbinsäure (Vit. C). Die Gabe von 50  $\mu\text{M}$  Vit. C 30 Minuten vor Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  verhinderte eine Reduktion der Zahl lebender Zellen sowie eine Zunahme des Anteils nekrotischer Kardiomyozyten (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Nachweis vitaler, Hoechst33258 positiver sowie nekrotischer, PI-positiver Zellen mittels Hoechst-Assay: Einfluss von 30-minütiger Präinkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Vit.C auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$  [1  $\mu\text{M}$ ] -induzierte Reduktion vitaler Zellen bzw. Zunahme PI-positiver Zellen. Werte stellen Mittelwerte + SD dar.  $n = 10$  pro Gruppe, mindestens 3 unabhängige Experimente. “\*\*\*“ Vergleich zur Kontrolle, \*\*\* =  $p < 0,001$ ; „##“ Vergleich zur  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gruppe, ### =  $p < 0,001$

Zur Untersuchung potentieller protektiver Effekte von Adiponektin und der CTRPs wurden je 2 Schalen mit 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Adiponektin oder 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$  der CTRPs über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert. Zudem wurden ebenfalls je zwei Schalen 30 Minuten nach der beschriebenen Behandlung mit Adiponektin, CTRP 1, 2, 7 und 9 mit 1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$

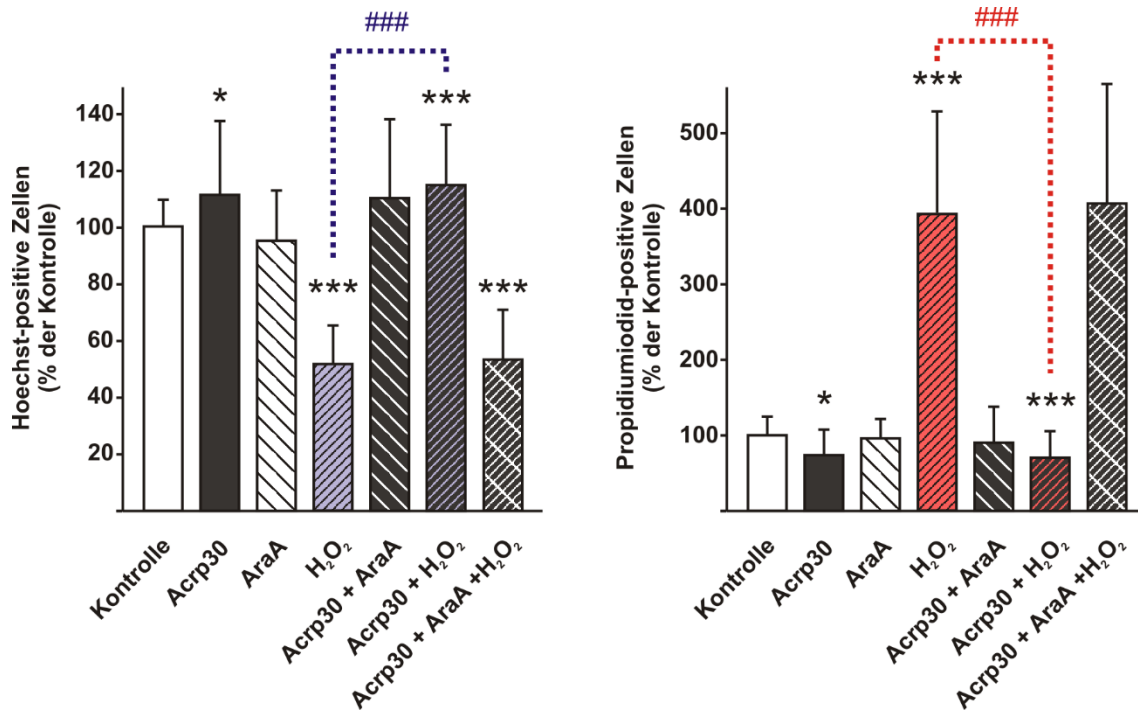
versetzt. Um eine mögliche Beteiligung der AMPK zu untersuchen, wurden einige Schalen 30 Minuten vor der eigentlichen Stimulation mit Acrp30 oder den CTRPs mit dem AMPK-Inhibitor AraA behandelt. Abbildung 19 zeigt representative Durchlichtaufnahmen eines der hier beschriebenen Experimente. Durch rote Pfeile werden abgerundete, nekrotische Zellen hervorgehoben.



**Abbildung 19:** Repräsentative Durchlichtaufnahmen isolierter adulter Rattenkardiomyozyten. Die Zellen wurden mit 4 µg/ml Adiponektin (Acrp30), 4 µg/ml CTRP 9, 1 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie 0,5 mM AraA in den dargestellten Kombinationen behandelt, wobei die Gabe von AraA 30 Minuten vor Stimulation mit Adiponektin / CTRP 9 erfolgte, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dagegen 30 Minuten nach Adiponektin- / CTRP 9-Behandlung zugesetzt wurde. Nekrotische Zellen sind durch rote Pfeile hervorgehoben.

Wie in Abbildung 20 dargestellt führte die Behandlung der Zellen mit 1 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer signifikanten Reduktion stabförmiger, vitaler Kardiomyozyten sowie zu einer Zunahme der Zahl nekrotischer Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Diese Abnahme der Anzahl vitaler Zellen konnte durch Adiponektinstimulation verhindert werden, basal fand sich sogar ein signifikant größerer Anteil stabförmiger Kardiomyozyten. Während die alleinige Gabe von AraA die

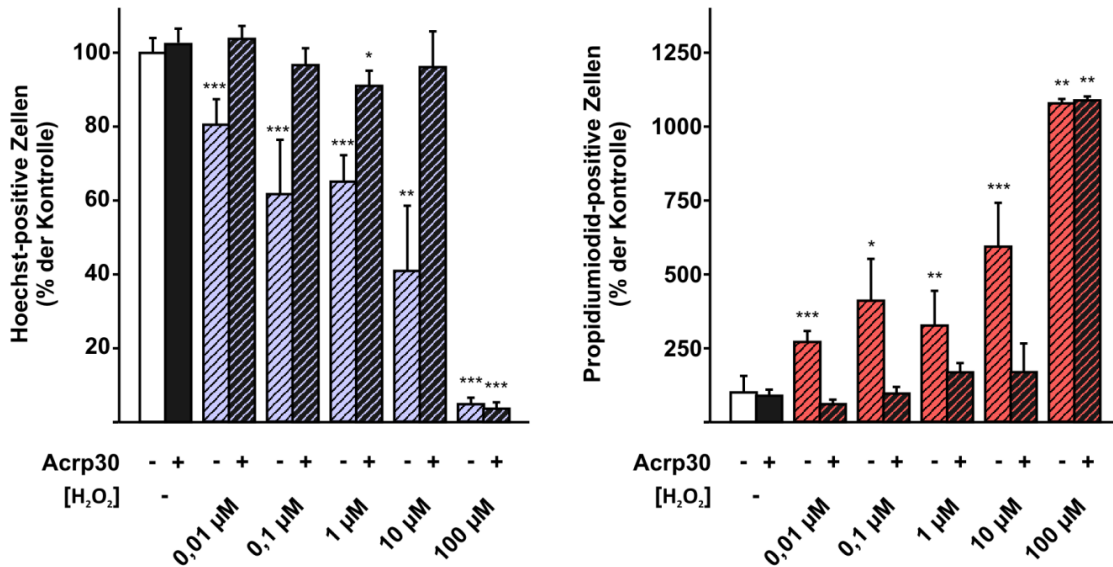
Zahl Hoechst- und PI-positiver Zellen nicht beeinflusste, sank die Anzahl der vitalen Zellen nach Hemmung der AMPK und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung erneut, verbunden mit einer signifikanten Steigerung des Anteils nekrotischer Kardiomyozyten etwa um das Vierfache der Kontrolle.



**Abbildung 20:** Nachweis vitaler, Hoechst 33258 positiver sowie nekrotischer, PI-positiver Zellen mittels Hoechst-Assay nach Behandlung mit Adiponektin [4 µg/ml]. Werte stellen Mittelwerte + SD dar. n = 10 pro Gruppe, mindestens 3 unabhängige Experimente. „\*“ Vergleich zur Kontrolle, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001; „#“ Vergleich zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gruppe, ### = p < 0,001

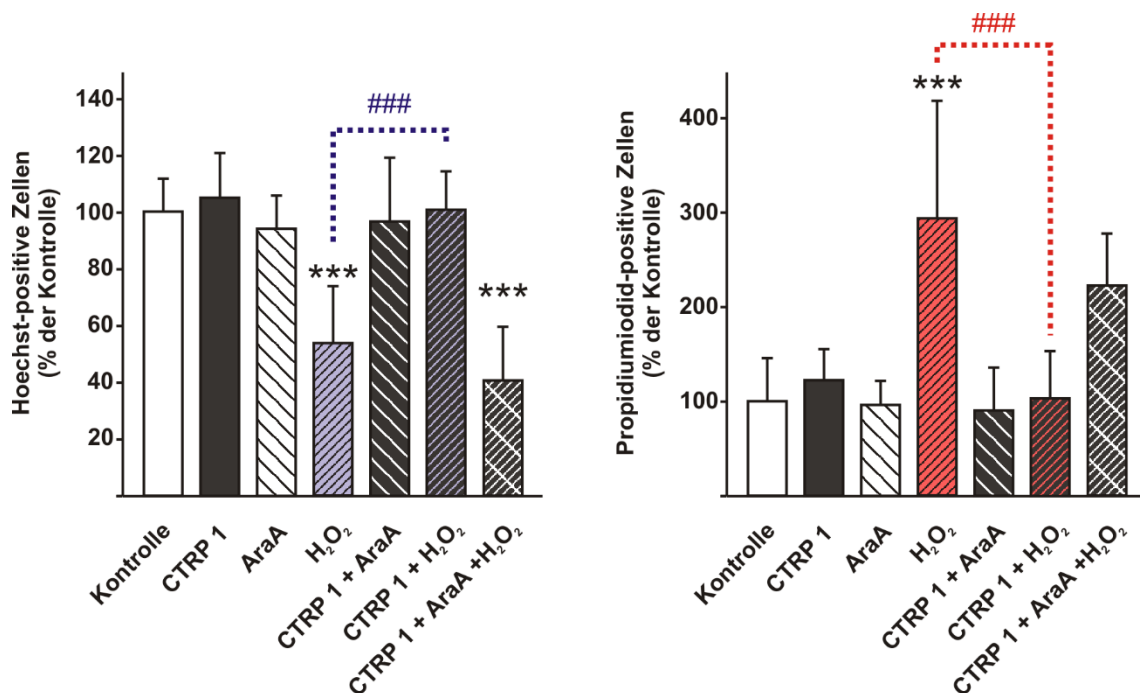
Um herauszufinden, bis zu welchen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen Adiponektin die isolierten Kardiomyozyten vor dem Übergang in die Nekrose bewahrt, wurde in einem weiteren Versuch steigende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 0,01 µM bis 100 µM eingesetzt. Wie aus Abbildung 21 hervorgeht, konnte die Präinkubation mit Adiponektin die Anzahl vitaler Kardiomyozyten bis zu einer Konzentration von 10 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konstant halten. Auch der Anteil nekrotischer, PI-positiver Zellen unterschied sich bis zu dieser Konzentration nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe.





**Abbildung 21:** Nachweis vitaler, Hoechst33258 positiver sowie nekrotischer, PI-positiver Zellen mittels Hoechst-Assay nach Behandlung mit Adiponektin [4 µg/ml] sowie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in steigender Konzentration. Dargestellte Werte stellen Mittelwerte + SD dar. n = 10 pro Gruppe, mindestens 3 unabhängige Experimente. \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001

Neben Adiponektin wurden auch die CTRPs hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Vitalität der isolierten Kardiomyozyten unter Einfluss von ROS untersucht.

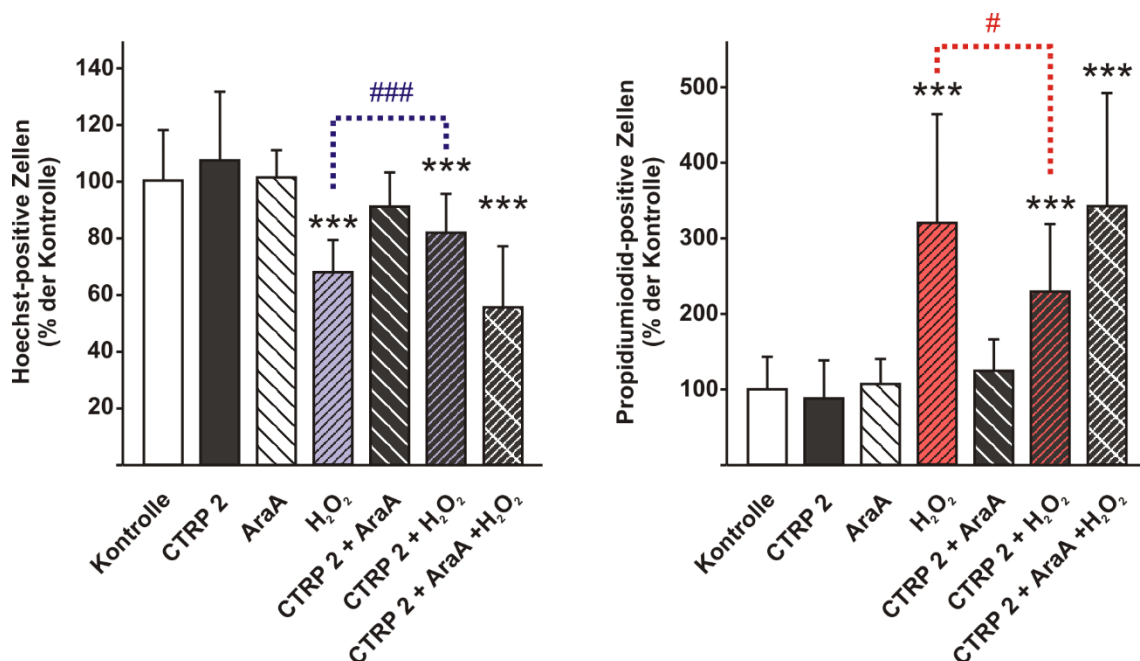


**Abbildung 22:** Nachweis vitaler, Hoechst33258 positiver sowie nekrotischer, PI-positiver Zellen mittels Hoechst-Assay nach Behandlung mit CTRP 1 [4 µg/ml]. Dargestellte Werte stellen Mittelwerte + SD dar. n = 10 pro Gruppe, mindestens 3 unabhängige Experimente. „\*“ Vergleich zur Kontrolle, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001; „#“ Vergleich zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gruppe, ### = p < 0,001



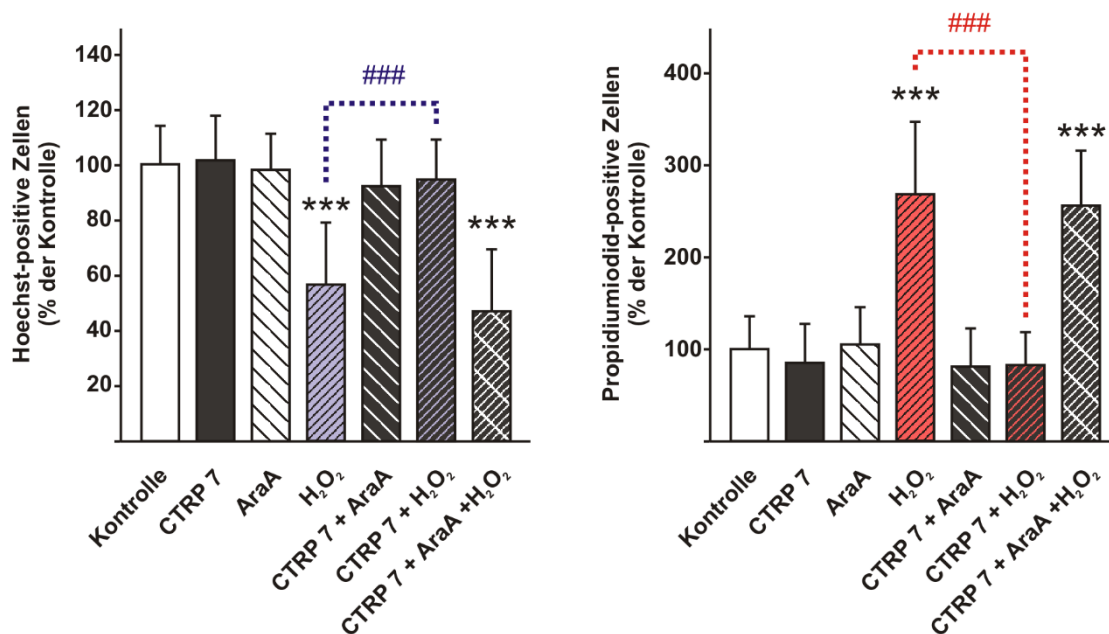
Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, verhinderte die Präinkubation mit 4 µg/ml CTRP 1 die signifikante Reduktion der Zahl vitaler Zellen nach alleiniger Gabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dahingegen resultierte die Hemmung der AMPK vor Stimulation mit CTRP 1 und nachfolgend H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einem signifikanten Absinken der Anzahl stäbchenförmiger, vitaler Kardiomyozyten auf ca. 40% der unbehandelten Kontrollgruppe und einem ebenfalls signifikanten Anstieg des Anteils nekrotischer, Propidiumiodid-positiver Zellen.

Unter den in dieser Arbeit untersuchten Adiponektin-Paralogen zeigte CTRP 2 die schwächsten Effekte hinsichtlich einer Protektion gegen oxidativen Stress. Während die alleinige Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wie in den bereits beschriebenen Experimenten zu einem signifikanten Abfall der Zahl vitaler Stäbchen sowie einem Anstieg des Anteils PI-positiver Zellen führte, konnte die Präinkubation mit CTRP 2 einen Anstieg nekrotischer Kardiomyozyten nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gabe nicht vollständig verhindern. So war in dieser Gruppe die Anzahl vitaler Zellen einerseits signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert, verbunden mit einem vermehrten Anteil PI-positiver Zellen, andererseits waren ebenfalls signifikante Unterschiede gegenüber der ausschließlich mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Gruppe feststellbar (Abbildung 23).



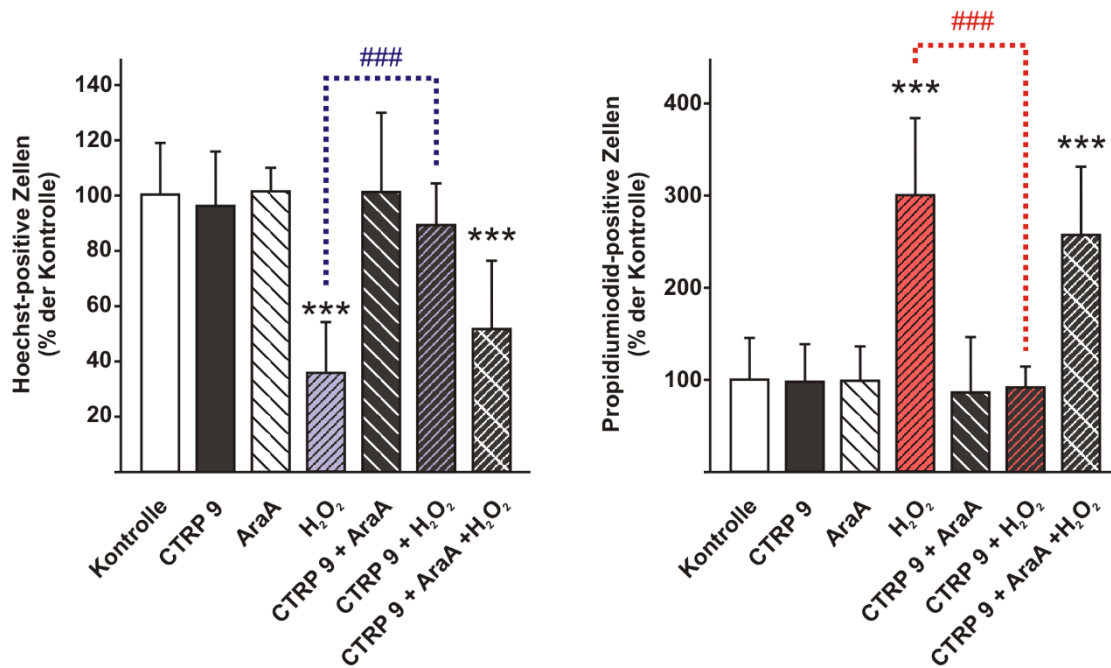
**Abbildung 23:** Nachweis vitaler, Hoechst 33258 positiver sowie nekrotischer, PI-positiver Zellen mittels Hoechst-Assay nach Behandlung mit CTRP 2 [4µg/ml]. Dargestellte Werte stellen Mittelwerte + SD dar. n = 10 pro Gruppe, mindestens 3 unabhängige Experimente. „\*“ Vergleich zur Kontrolle, \*\*\* = p < 0,001; „#“ Vergleich zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gruppe, # = p < 0,05, ### = p < 0,001

Im Gegensatz zu CTRP 2 führte die Vorbehandlung mit 4µg/ml CTRP 7 mit nachfolgender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gabe weder zu einer signifikanten Reduktion der vitalen, Hoechst-positiven Zellen, noch zu einem Anstieg der nekrotischen Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dahingegen resultierte in diesen Versuchen sowohl die alleinige Gabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, als auch die Inhibition der AMPK mittels AraA vor der Inkubation mit CTRP 7 sowie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einem signifikanten Abfall der stäbchenförmigen und zu einem signifikant gesteigerten Anteil der nekrotischen Kardiomyozyten (Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Nachweis vitaler, Hoechst 33258 positiver sowie nekrotischer, PI-positiver Zellen mittels Hoechst-Assay nach Behandlung mit CTRP 7 [4µg/ml]. Dargestellte Werte stellen Mittelwerte + SD dar.  $n = 10$  pro Gruppe, mindestens 3 unabhängige Experimente. „\*“ Vergleich zur Kontrolle, \*\*\* =  $p < 0,001$ ; „#“ Vergleich zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gruppe, ### =  $p < 0,001$

Ebenso schützte die Präinkubation mit CTRP 9 die Kardiomyozyten vor ROS-induzierter Nekrose. Der beobachtete protektive Effekt wurde wiederum durch Inhibition der AMPK vor CTRP-Gabe verhindert (Abbildung 25). Wie bereits auch bei Adiponektin und den anderen CTRPs beobachtet, hatte weder die alleinige Gabe von AraA, noch die Kombination mit den genannten Substanzen einen negativen Einfluss auf die Anzahl nekrotischer Zellen.



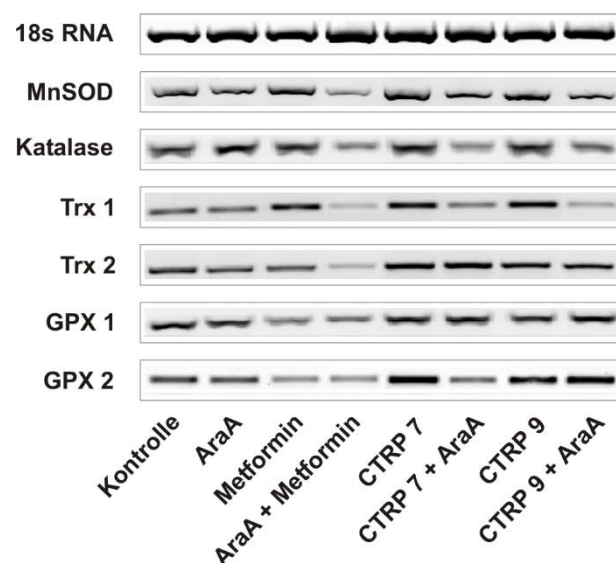
**Abbildung 25:** Nachweis vitaler, Hoechst 33258 positiver sowie nekrotischer, PI-positiver Zellen mittels Hoechst-Assay nach Behandlung CTRP 9 [4 µg/ml]. Dargestellte Werte stellen Mittelwerte + SD dar.  $n = 10$  pro Gruppe, mindestens 3 unabhängige Experimente. „\*“ Vergleich zur Kontrolle, \*\*\* =  $p < 0,001$ ; „#“ Vergleich zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gruppe, ### =  $p < 0,001$

### 3.4.2 Einfluss von CTRP 7 und 9 auf antioxidative Schutzmechanismen

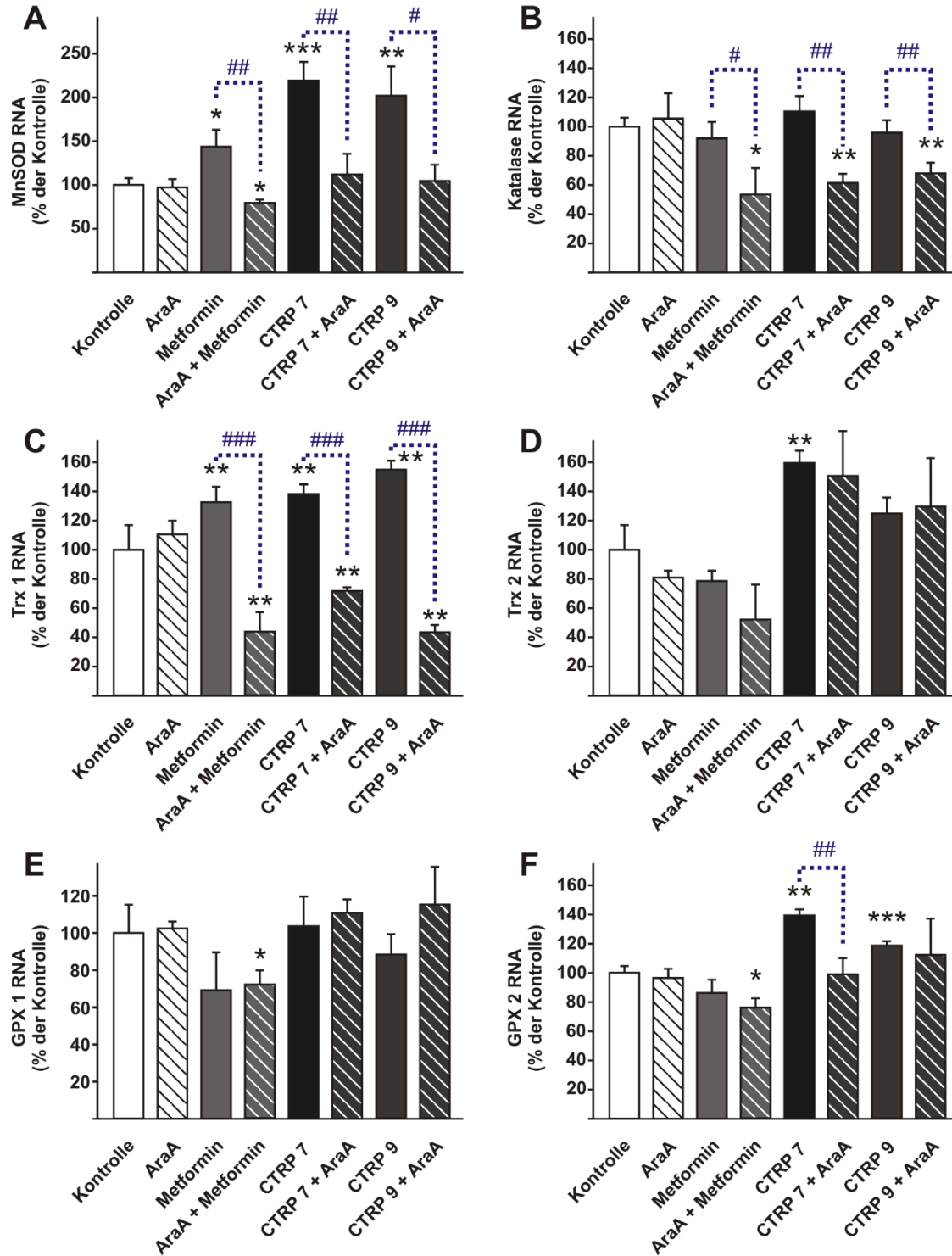
Der aerobe Organismus verfügt über ein komplexes Schutzsystem bestehend aus einer Kaskade von Enzymen, welche reaktive Sauerstoffspezies in mehreren Schritten zu Wasser und elementarem Sauerstoff umwandeln [26]. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe an H9c2-Zellen mit Hilfe des CellROX<sup>®</sup> Green Reagenz verhinderte die Präinkubation mit CTRP 7 und 9 einen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten, intrazellulären ROS-Anstieg. Um den vermuteten Einfluss des antioxidativen Schutzsystems zu prüfen, wurde in dieser Arbeit die Aktivierung ausgewählter Enzyme nach Langzeitinkubation über 24 Stunden mit CTRP 7 oder CTRP 9 (je 4 µg/ml) mittels semiquantitativer PCR untersucht. Da für Metformin eine Aktivierung der MnSOD- (Manganhaltige SOD), Trx1-, Trx2- und der Catalase-Genexpression in der Literatur beschrieben ist [42, 110, 121], wurde das Biguanid (2mM) als Positivkontrolle eingesetzt. Metformin ist zudem ein bekannter AMPK-Aktivator in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen, u.a. in Hepatozyten und Skelettmuskelzellen [82], aber auch in kardialen Gewebe [14]. Ergänzend diente in

einigen Gruppen AraA, welches 30 Minuten vor der eigentlichen Stimulation in einer Konzentration von 0,5 mM eingesetzt wurde, als AMPK-Inhibitor.

Wie die Abbildungen 26 und 27 zeigen, steigerten CTRP 7 und 9 sowie Metformin signifikant die mRNA-Expression der mitochondrialen Superoxiddismutase. Durch Präinkubation mit AraA wurde diese Expressionssteigerung verhindert. Dagegen zeigten sich keine Unterschiede in der Expression der Katalase durch Stimulation mit Metformin, CTRP 7 oder 9. Interessanterweise führte jedoch die Präinkubation mit AraA jeweils zu einer signifikanten Abnahme der Katalaseexpression auf Transkriptionsebene im Vergleich zur unbehandelten Referenz. Sowohl Metformin, als auch beide CTRPs steigerten signifikant die Expression von Thioredoxin 1, was durch AMPK-Hemmung verhindert wurde. Dagegen wurde die Transkription von Trx 2 zwar ebenfalls signifikant durch CTRP 7 und tendenziell durch CTRP 9 gesteigert, allerdings hatte hier weder die Gabe von Metformin, noch die Hemmung der AMPK durch Ara einen Einfluss auf die Enzymexpression. Während die Expression der Glutathionperoxidase 1 in der vorliegenden Arbeit durch Stimulation mit CTRP 7 und 9 nicht beeinflusst wurde, induzierten beide Substanzen signifikant die Glutathionperoxidase 2 auf RNA-Ebene. Dabei wurde die CTRP 7-vermittelte Induktion im Gegensatz zur Expressionssteigerung nach CTRP 9-Behandlung durch Gabe von AraA inhibiert.



**Abbildung 26:** Änderung der mRNA-Expression der MnSOD, Katalase, Trx1, Trx2, GPX1 sowie GPX2 in Rattenkardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit AraA [0,5mM], Metformin [2mM], CTRP 7 oder CTRP 9 [4µg/ml].

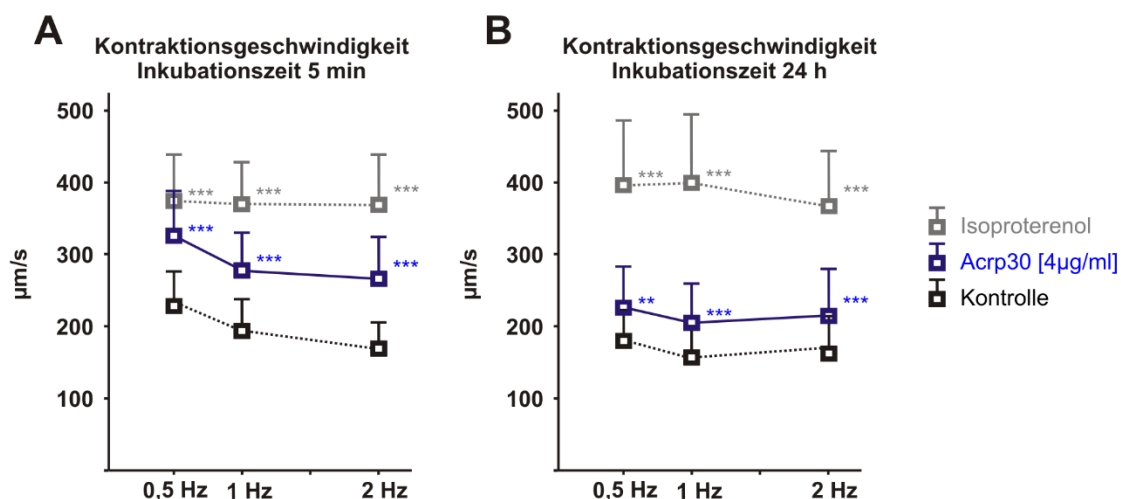


**Abbildung 27:** Änderung der mRNA-Expression der MnSOD (A), Katalase (B), Trx1 (C), Trx2 (D), GPX1 (E) sowie GPX2 (F) in Rattenkardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit AraA [0,5mM], Metformin [2mM], CTRP 7 oder CTRP 9 [4µg/ml]. Dargestellte Werte stellen Mittelwerte + SD dar.  $n = 3$  pro Gruppe, 3 unabhängige Experimente. „\*“ Vergleich zur Kontrolle,  $* = p < 0,05$ ,  $** = p < 0,01$ ,  $*** = p < 0,001$ ; „#“ Vergleich zwischen Behandlungsgruppen,  $\# = p < 0,05$ ,  $\#\# = p < 0,01$ ,  $\#\#\# = p < 0,001$

### 3.5 Einfluss von Adiponektin und der CTRPs 1, 2, 7 und 9 auf die kontraktile Antwort adulter Rattenkardiomyozyten im elektrischen Feld

Die Herzinsuffizienz gilt als gemeinsame Endstrecke einer Vielzahl kardialer Pathologien, wobei ein systolisches, also die Kontraktion betreffendes Versagen, von einer diastolischen Form, welche mit beeinträchtigter Relaxation einhergeht, unterschieden wird [57]. In dieser Arbeit sollte zunächst ein potentieller Einfluss von Adiponektin und/oder der CTRPs 1, 2, 7 und 9 auf die basale Zellverkürzung isolierter Kardiomyozyten untersucht werden. Hierzu wurde ein System zur Erkennung von Zellgrenzen eingesetzt. Die isolierten Zellen wurden zunächst 5 Minuten oder 24 Stunden mit Adiponektin (4 $\mu$ g/ml) bzw. CTRP 1, 2, 7 oder 9 (je 4 $\mu$ g/ml) inkubiert und anschließend im elektrischen Feld stimuliert. Die Messung der Kontraktionsparameter erfolgte lastfrei im Kulturmedium und bei Raumtemperatur. Isoproterenol diente als Positivkontrolle und wurde in einer Konzentration von 10 nM jeweils 5 Minuten vor der elektrischen Stimulation sowohl in den 5-Minuten-, als auch in den 24-Stunden-Versuchen zugegeben.

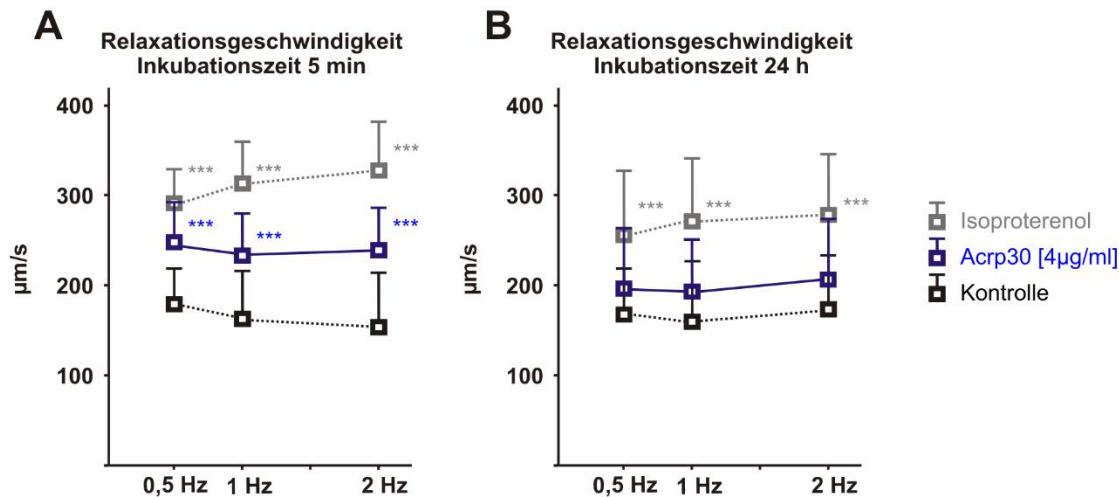
Wie Abbildung 28 zeigt, führte Adiponektin in einer Konzentration von 4 $\mu$ g/ml sowohl nach 5-minütiger, als auch nach 24-stündiger Inkubation zu einer signifikant über alle untersuchten Frequenzen gesteigerten Kontraktionsgeschwindigkeit.



**Abbildung 28:** Einfluss von Adiponektin auf die Kontraktionsgeschwindigkeit [ $\mu$ m/s] isolierter Kardiomyozyten: (A) Inkubationszeit 5 min, (B) Inkubationszeit 24 h;  $n = 15$  pro Gruppe, 3 unabhängige Experimente. Dargestellte Werte stellen Mittelwerte + SD dar. Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe sind mit \* gekennzeichnet; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

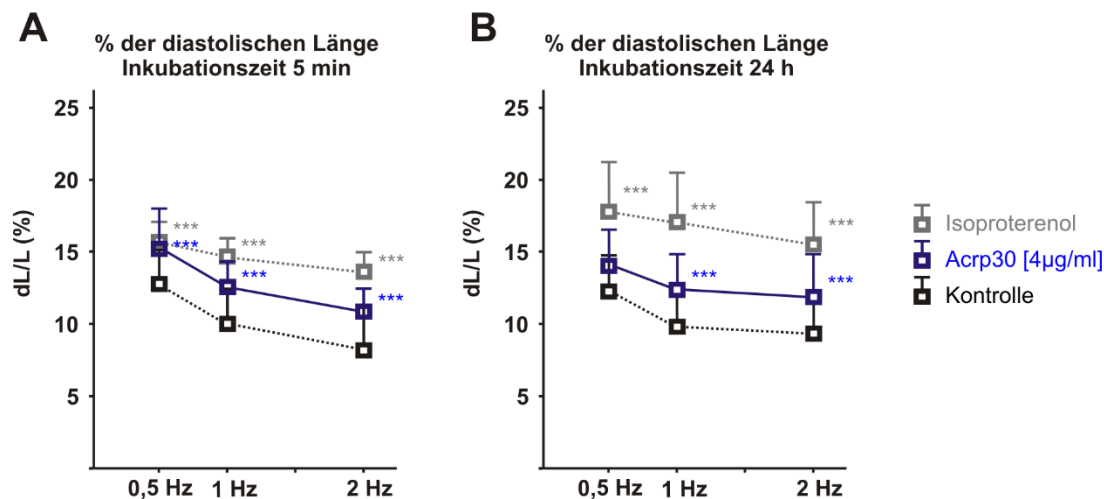


Auch die Relaxationsgeschwindigkeit war nach 5-minütiger Stimulation deutlich gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht. Dies zeigte sich tendenziell auch bei den über 24 Stunden behandelten Zellen, allerdings waren hier die Unterschiede nicht signifikant (Abbildung 29).



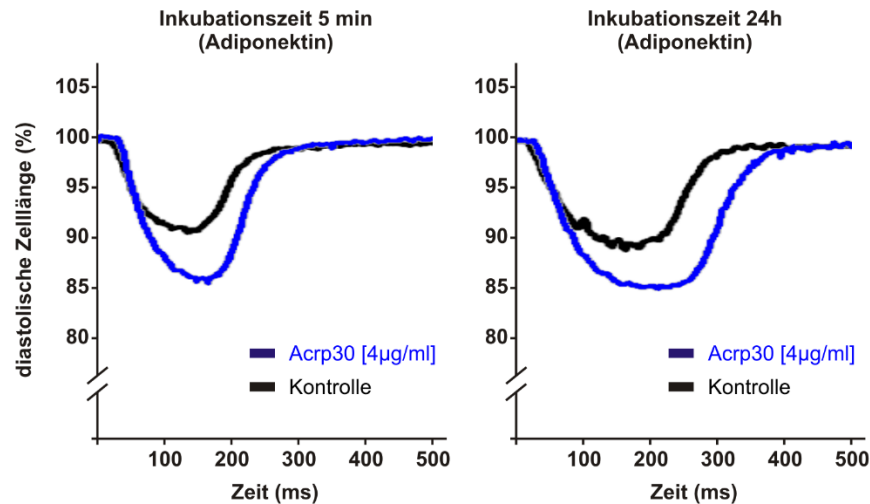
**Abbildung 29:** Einfluss von Adiponektin auf die Relaxationsgeschwindigkeit [ $\mu\text{m/s}$ ] isolierter Kardiomyozyten: (A) Inkubationszeit 5 min, (B) Inkubationszeit 24 h;  $n = 15$  pro Gruppe, 3 unabhängige Experimente. Dargestellte Werte stellen Mittelwerte + SD dar. Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe sind mit \* gekennzeichnet; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Insgesamt führte Adiponektin zu einer signifikant gegenüber der Kontrolle gesteigerten prozentualen Verkürzung (dL/L) der untersuchten Kardiomyozyten.



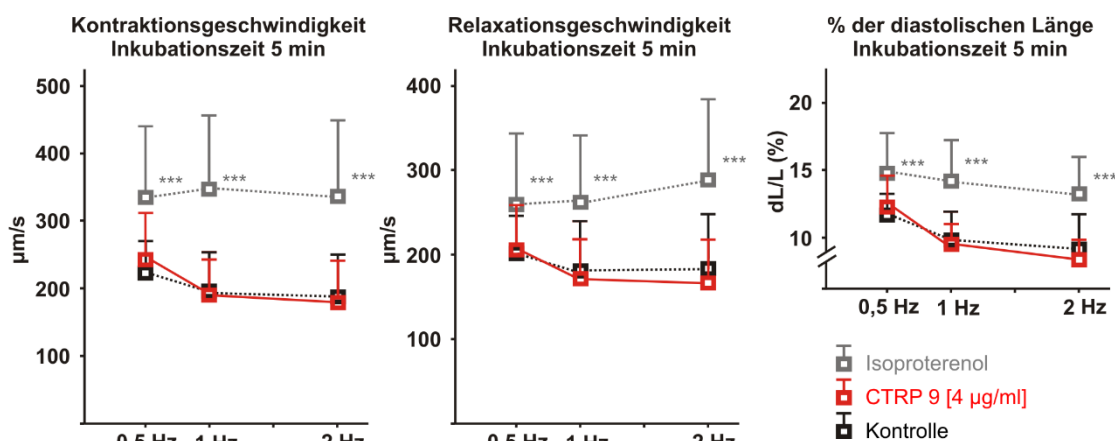
**Abbildung 30:** Einfluss von Adiponektin auf die Zellverkürzung [%] isolierter Kardiomyozyten: (A) Inkubationszeit 5 min, (B) Inkubationszeit 24 h;  $n = 15$  pro Gruppe, 3 unabhängige Experimente. Dargestellte Werte stellen Mittelwerte + SD dar. Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe sind mit \* gekennzeichnet; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Dieser Effekt konnte sowohl bei Kurz-, als auch bei Langzeitinkubation beobachtet werden (Abbildung 30). Abbildung 31 zeigt repräsentative Einzelzellmessungen nach Stimulation der Kardiomyozyten mit Adiponektin:



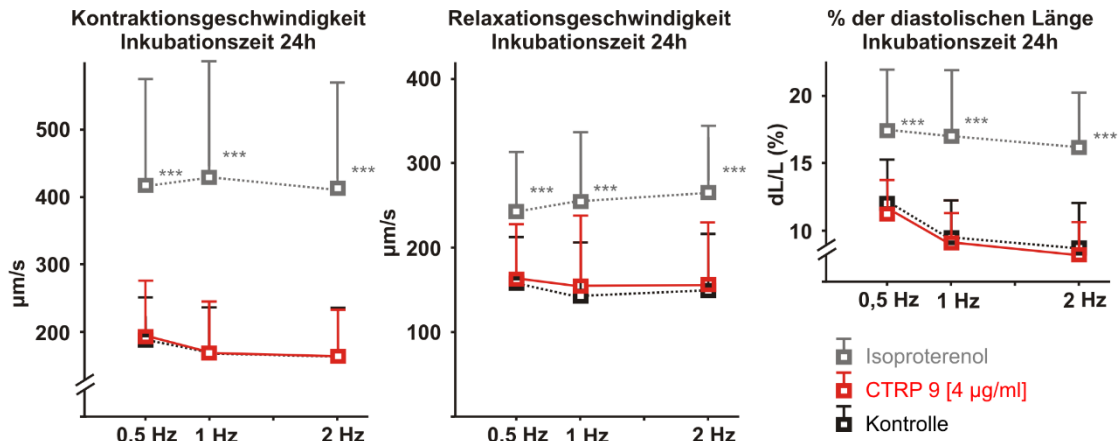
**Abbildung 31:** Repräsentative Einzelzellmessungen: Die Zellen wurden für 5 Minuten oder für 24 Stunden mit Adiponektin (Acrp30, 4µg/ml) stimuliert. Gezeigt ist Verlauf einer einzelnen Kontraktion bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz.

Im Gegensatz dazu hatte die Gabe von 4µg/ml CTRP 1, 2, 7 oder 9 für 5 Minuten oder 24 Stunden weder Einfluss auf die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit, noch auf die prozentuale Zellverkürzung (Ergebnisse exemplarisch für CTRP 9 gezeigt; Abbildung 32 und 33):



**Abbildung 32:** Einfluss von CTRP 9 auf Kontraktionsgeschwindigkeit, Relaxationsgeschwindigkeit und Zellverkürzung [%] isolierter Kardiomyozyten bei einer Inkubationszeit von 5 min, n = 15 pro Gruppe, 3 unabhängige Experimente. Dargestellte Werte stellen Mittelwerte + SD dar. Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe sind mit \* gekennzeichnet; \*\*\* =  $p < 0,001$ .





**Abbildung 33:** Einfluss von CTRP 9 auf Kontraktionsgeschwindigkeit, Relaxationsgeschwindigkeit und Zellverkürzung [%] isolierter Kardiomyozyten bei einer Inkubationszeit von 24 h,  $n = 15$  pro Gruppe, 3 unabhängige Experimente. Dargestellte Werte stellen Mittelwerte + SD dar. Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe sind mit \* gekennzeichnet; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

## **4 Diskussion**

### **4.1 Expression der CTRPs: Ausmaß und Einflussfaktoren**

#### **4.1.1 Kardiale Expression der CTRPs**

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob und in welchem Ausmaß die Adiponektinparaloge CTRP 1, 2, 7 und 9 im Rahmen von Erkrankungen wie Adipositas, bei Herzinsuffizienz oder im Alter differentiell in kardialen Gewebe exprimiert werden. Während in der Literatur zunächst davon ausgegangen wurde, dass Acrp30 ausschließlich von Adipozyten gebildet und in das Blut abgegeben wird [102], konnte in mehreren Studien die Adiponektinfreisetzung durch andere Gewebe gezeigt werden. So wiesen Pineiro et al. die Produktion von Acrp30 sowohl in murinen, adulten Vorhofkardiomyozyten, als auch in humanen atrialen Kardiomyozyten nach [96], wobei die Menge des kardial exprimierten Acrp30 mit einem Verhältnis von 1/120.000 nur einem Bruchteil des im Fettgewebe gebildeten Adiponektins entspricht [113].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass im rechten Vorhof sowie im linken Ventrikel des Menschen auch die Adiponektinparaloge CTRP 1, 2, 7 und 9 exprimiert werden. In Einklang mit der bisherigen Studienlage wurde in eigenen Vorversuchen der Arbeitsgruppe zudem die Expression dieser CTRPs im Herzen adulter Ratten gezeigt. So ergeben quantitative Analysen anderer Gruppen mittels real-time-PCR ebenfalls individuelle Expressionsmuster in murinen Geweben, wobei die CTRPs wie auch Adiponektin überwiegend im Fett, jedoch auch kardial gebildet werden [45, 135, 136]. Während dabei im Fettgewebe signifikant mehr Adiponektin als CTRPs freigesetzt wird, übersteigen die kardialen mRNA-Level von CTRP 1, 2, 7 und 9 die des Adiponektins um ein Vielfaches [113]. Su et al. konnten zudem für CTRP 9 zeigen, dass die Menge des kardial exprimierten CTRP 9 die im Blut nachgewiesenen Konzentrationen signifikant übersteigt [113].

#### **4.1.2 Expression und Freisetzung der CTRPs in Abhängigkeit von Alter und Ernährungsstatus**

Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl kurz-, als auch langzeitige Änderungen des Ernährungszustandes die Serumspiegel von Insulin, aber auch der Adipozytokine Leptin und Adiponektin sowie weiterer Hormone beeinflussen [4, 38, 111, 139]. Dem Fettgewebe wird bezüglich der Expression dieser Substanzen eine besondere Bedeutung

beigemessen. Mäuse, welche eine Mutation im Leptingen nachweisen und die einen adipösen Phänotyp (*obese/obese*; *ob/ob*) entwickeln [140], zeigen altersabhängige Veränderungen der CTRP-Expression. So konnte in 8-Wochen alten *ob/ob*-Mäusen sowohl eine signifikant gesteigerte Expression von Acrp30, als auch der CTRPs 1, 2, 7 und 9 im Fettgewebe nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war die mRNA-Expression von Adiponektin in 12 Wochen alten Tieren signifikant erniedrigt, wohingegen bei den CTRPs kein Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden konnte [134, 135]. Durch Untersuchungen an *DIO* (*diet induced obese*) Mäusen konnte zudem gezeigt werden, dass die langfristige Zufuhr hochkalorischer Nahrung zu reduzierten Serumspiegeln von CTRP 1 und 9 führt [56, 94, 95]. Diese Beobachtungen deuten auf frühe, der Entwicklung von Übergewicht vorangehende Kompensationsmechanismen hin. Acrp30-*knockout*-Mäuse entwickeln bei normaler Nahrungszufuhr einen moderaten metabolischen Phänotyp, was ebenfalls kompensatorische, ggf. CTRP-vermittelte Effekte auch unter basalen Bedingungen vermuten lässt [113].

Am Menschen untersuchten erstmals Arita et al. mittels ELISA die Adiponektinkonzentration im Plasma normosomer (BMI  $22,8 \pm 2,2 \text{ kg/m}^2$ ) und adipöser (BMI  $31,9 \pm 5,5 \text{ kg/m}^2$ ) Probanden, wobei die Acrp30-Plasmaspiegel Übergewichtiger signifikant gegenüber den Kontrollen erniedrigt waren [4]. Neben der Adipositas führen auch Diabetes mellitus Typ 2 oder die koronare Herzkrankheit zu einer verringerten Adiponektinkonzentrationen im Blut [46]. Im Gegensatz zu Acrp30 existieren bislang jedoch nur wenige Erkenntnisse zur humanen Expression oder Serumkonzentrationen der CTRPs. Signifikant erhöhte CTRP 1-Blutkonzentrationen sind in Patienten mit arteriellem Hypertonus [54] oder dem metabolischem Syndrom [13] detektierbar, wobei in diesen Individuen eine Korrelation zwischen CTRP 1-Konzentration und Blutzuckerspiegel, HbA1c-Wert sowie BMI beschrieben wird. Hwang et al. zeigten für CTRP 9, dass dessen Serumspiegel einerseits positiv mit der Adiponektinkonzentration und andererseits negativ mit Alter, arteriellem Blutdruck, Nüchtern-Blutzuckerspiegel sowie Fettstoffwechsel-Markern des Probanden korreliert [48].

Aus Untersuchungen an Tiermodellen ist bekannt, dass auch die kardiale CTRP-Expression durch das Alter und Störungen des Metabolismus beeinflusst wird. So analysierten Su et al. mRNA- und Proteinkonzentrationen von CTRP 9 im kardialen

Gewebe von HFD (*high fat diet*)-Mäusen im Vergleich zu ND (*normal diet*) Tieren. HFD führte dabei im Vergleich zu den Kontrolltieren zunächst zu einem Anstieg der kardialen CTRP 9-mRNA- und Proteinkonzentration nach zwei bis vier Wochen, gefolgt von einem signifikanten Abfall nach acht und 16 Wochen [113]. Als zugrunde liegender Mechanismus wird die Dysbalance inflammatorischer Botenstoffe im Rahmen der Adipositas angenommen, wobei der regulatorischen Funktion von TNF- $\alpha$  eine besondere Bedeutung zugemessen wird. TNF- $\alpha$  führt einerseits zu einer erhöhten Aktivität von Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Acrp30 unterdrücken. Andererseits werden Transkriptionsfaktoren wie PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ), welche zu einer verstärkten Produktion sowohl von Adiponektin, als auch von CTRP 9 führen, gehemmt [113]. Die Beobachtung, dass HFD zu einer Reduktion der kardialen CTRP-Expression führt, deckt sich teilweise mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. So zeigte sich in der Altersgruppe der <50-Jährigen auch bei CTRP 1 und 7 eine signifikant erniedrigte mRNA-Konzentration bei Übergewichtigen im Vergleich zu normosomen Individuen. Allerdings war die kardiale Expression von CTRP 7 und 9 bei älteren Übergewichtigen im Vergleich zur normalgewichtigen Alterskontrolle signifikant erhöht. Ergänzend konnte eine Studie der Arbeitsgruppe aufzeigen, dass sowohl die Blutkonzentration, als auch die Expression von Acrp30 im epikardialen Fettgewebe älterer normosomer und adipöser Patienten signifikant gegenüber <50-Jährigen erniedrigt ist [86]. Die erstmals in der vorliegenden Arbeit gezeigte Heraufregulation von CTRP 7 und 9 im Herzen adipöser, älterer Patienten lassen vermuten, dass diese CTRPs ein durch fortgeschrittenes Alter sowie Adipositas bedingtes Adiponektin-Defizit kompensieren könnten.

#### 4.1.3 Expression und Freisetzung der CTRPs im Rahmen kardialer Pathologien

Im Gegensatz zu Acrp30 [106] ist die Expressionsregulation der CTRPs bislang nur unvollständig verstanden. Kambara et al. untersuchten an C57BL/6J-Mäusen die Auswirkung von Ischämie-Reperfusion (I/R) auf Plasmaspiegel und Freisetzung von CTRP 9 im Fettgewebe. I/R führte dabei zu einem signifikanten Abfall der CTRP 9-Plasmakonzentration, wobei der einhergehende Anstieg freier Fettsäuren (*free fatty acids* = FFA) im Plasma von den Autoren als mögliche Ursache von oxidativem Stress und damit einer Dysregulation der Adipozytokinproduktion diskutiert wird [56]. Auch Sun et

al. zeigten einen Einfluss myokardialer Schäden auf Freisetzung und Blutkonzentration von CTRP 9 in adulten Mäusen. Hierbei kam es zu einer initialen Abnahme der CTRP 9 Expression im Fettgewebe bis zum dritten Tag nach Myokardinfarkt, verbunden mit erniedrigten Serumspiegeln des Adiponektinparalogs und gefolgt von einem langsamen Wiederanstieg beider Parameter [114].

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeproben des linken Ventrikels von je zehn gesunden Transplantationsspendern, zehn Patienten mit nachgewiesener ischämischer Kardiomyopathie (ICM) sowie von zehn Spendern mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) auf RNA- und Proteinebene analysiert. Im Rahmen dieser Versuche konnte erstmals gezeigt werden, dass die Expression der CTRPs 7 und 9 in humanen ICM- und DCM-Herzen sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene erhöht ist. Interessanterweise zeigen *Microarray*-, *Real-time* PCR-, sowie Western-Blot-Analysen von Skurk et al. in Patienten mit DCM eine signifikante Adiponektin-Herunterregulation im rechten Ventrikel auf RNA- und Proteinebene, welche sowohl von den Serumspiegeln des Adipozytokins, als auch von TNF- $\alpha$  unabhängig ist. Ergänzend zeigten *in vitro*-Versuche, dass eine Hemmung der Adiponektin-Freisetzung durch Monensin, welches den intrazellulären Proteintransport unterdrückt, in neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten zu einer gesteigerten RNA-Expression von Acrp30 sowie beider Adiponektinrezeptoren führt [108]. Im Einklang mit diesen Ergebnissen von Skurk et al. lässt auch eine Studie von Casselli et al. Rückkopplungsmechanismen vermuten, über welche die kardiale Acrp30-Expression auf lokaler Ebene reguliert wird. So konnte anhand eines DCM-Schweinemodells eine durch hochfrequente Schrittmacherstimulation induzierte, regionale Abnahme der myokardialen Adiponektin-mRNA-Expression gezeigt werden. Diese war sowohl mit einer gesteigerten AdipoR1-Expression in den entnommenen LV-Proben, als auch mit einer gestörten Kontraktilität der untersuchten Herzen assoziiert [12]. Die zum ersten Mal im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigte Heraufregulation der CTRPs 7 und 9 im geschädigten humanen Herz könnte ebenfalls über solche lokalen Rückkopplungsmechanismen gesteuert sein. Im Gegensatz zu Acrp30 zirkulieren CTRPs nur in geringen Mengen im Plasma, weshalb für die Paraloge überwiegend auto- und parakrine biologische Funktionen angenommen werden [136]. Vorstellbar wäre, dass eine lokale Adiponektin-Defizienz kompensatorisch zu einem Anstieg der myokardialen Expression von CTRP 7 und 9 führt. Aus der Literatur ist zudem bekannt, dass CTRP 9 über den AdipoR1/AMPK-Signalweg kardioprotektive

Effekte ausübt [56, 142]. Daher wurde in Folge der Einfluss von CTRP 1, 2, 7 und 9 auf die AMPK-Signalkaskade untersucht.

#### **4.2 Einfluss von Adiponektin und der CTRPs 1, 2, 7 und 9 auf die AMPK und nachgeschaltete Signalwege**

Eine Adiponektin-vermittelte Phosphorylierung der AMPK an Thr172 sowie der ACC an Position Ser79 wurde sowohl in murinen C2C12-Zellen [137], als auch in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte gezeigt [67, 92]. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mitglieder der CTRP-Proteinfamilie sind in der Lage, über Aktivierung der AMPK die Phosphorylierung der ACC in adulten Herzmuskelzellen zu bewirken, wie zuvor sowohl für CTRP 1, als auch für CTRP 2 in murinen C2C12- und L6-Myotuben nachgewiesen werden konnte [94, 136]. Für CTRP 9 ist in der Literatur eine AMPK-Aktivierung in C2C12-Myotuben sowie in neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten beschrieben [56, 134]. Im Vergleich zu den neonatalen Zellen wird für adulte, ausdifferenzierte Kardiomyozyten der Ratte eine größere Ähnlichkeit zu adulten humanen Herzmuskelzellen angenommen. Zudem wirkt sich der Differenzierungsgrad auf die Expression bestimmter Enzymisoformen aus [126]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zunächst der Einfluss der CTRPs 1, 2, 7 und 9 auf die Phosphorylierung der AMPK an Position Thr172 sowie der ACC an Position Ser79 in isolierten adulten Kardiomyozyten der Ratte mit Hilfe von Western-Blot-Analysen untersucht. Dabei ergaben sich sowohl bei Adiponektin, als auch bei den CTRPs abhängig von der Stimulationszeit individuelle Phosphorylierungsprofile der untersuchten Enzyme. Die Adiponektin-vermittelte Phosphorylierung der AMPK ähnelte im Zeitverlauf den Ergebnissen von Li et al. [67]. Während das Zeitmuster der ACC-Phosphorylierung sowohl nach Adiponektin-, als auch nach CTRP 9-Gabe grundlegend dem der AMPK entsprach, fand sich bei CTRP 1 kein Wiederanstieg bei signifikant gesteigerter Phosphorylierung der AMPK nach 20 – 40 Minuten sowie nach 24 Stunden. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Behandlung mit CTRP 2 sowie mit CTRP 7 eine Phosphorylierung der ACC nach Langzeitinkubation ohne vorangegangene Steigerung der AMPK-Aktivität. Diese Ergebnisse lassen die folgenden Schlussfolgerungen zu:

- (1) Die CTRP-vermittelte Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase ist – zumindest partiell – unabhängig von der Aktivität der AMPK reguliert. Bisher sind in

humanen Geweben zwei Isoformen der Acetyl-CoA-Carboxylase beschrieben, die als ACC-1 und ACC-2 bezeichnet und gewebespezifisch exprimiert werden. Im Skelett- und Herzmuskel kann vor allem die ACC-2 nachgewiesen werden [8, 119]. Neben allosterischen Einflüssen spielt die kovalente Kontrolle durch Phosphorylierung eine wichtige Rolle in der Regulation der ACC. Inzwischen sind mehrere Phosphorylierungsstellen identifiziert, die sich unter anderem an den Aminosäurepositionen Ser23, Ser25, Ser29, Ser77, Ser79, Ser95, Ser221, Ser1200 und Ser1215 des Enzyms befinden [1, 19]. Die AMPK führt sowohl zur Phosphorylierung der in dieser Arbeit untersuchten Position Ser79, als auch der Positionen Ser1200 und Ser1215 [1, 19, 81]. Die ACC wird neben der AMPK durch eine Reihe weiterer Kinasen kovalent reguliert. Zu diesen Enzymen gehört die Proteinkinase A (PKA), welche die ACC an den Positionen Ser77 sowie Ser1200 phosphoryliert [32]. Einige neuere Studien deuten darauf hin, dass eine Aktivierung der Proteinkinase A sowohl im Rahmen von Adiponektin-, als auch von CTRP-vermittelten Effekten involviert zu sein scheint [91, 114, 125, 141]. Die Rolle der PKA und weiterer Kinasen in der CTRP-vermittelten Regulation der Acetyl-CoA-Carboxylase ist bislang jedoch nicht geklärt.

(2) Die Langzeitinkubation (80 Minuten bis 24 Stunden) insbesondere mit CTRP 9, in geringerem Maße aber auch mit CTRP 1, führte zu einem signifikanten Wiederanstieg der AMPK-Phosphorylierung. Dieser Doppelgipfel im Phosphorylierungsprofil der AMPK lässt einen Einfluss dieser CTRPs auf weitere Kinasen, welche verzögert zu einer AMPK-Aktivierung führen, vermuten. Solche Kinasen könnten einerseits ggf. der AMPK nachgeschaltet sein und im Sinne einer positiven Rückkopplung die erneute Phosphorylierung des Enzyms bewirken. Vorstellbar ist andererseits auch die Aktivierung paralleler oder übergeordneter Signalwege. So zeigten Collins et al. eine *in vivo* Phosphorylierung der Serin/Threonin-Kinase LKB1, welche zu den AMPK-Kinasen (AMPKKs) gezählt wird, durch die Protein-Kinase A (PKA) [17].

(3) Adiponektin sowie die untersuchten CTRPs weisen trotz struktureller Ähnlichkeiten der globulären Domäne signifikante Unterschiede in der Aktivierung bzw. Inaktivierung der AMPK und der ACC auf. Dies könnte zum einen in einer unterschiedlichen Affinität zu – bisher unbekannten – Rezeptoren begründet sein. Während AdipoR1, AdipoR2, T-Cadherin sowie Calreticulin als Adiponektinrezeptoren angesehen werden [47, 137], ist nur wenig über deren Rolle im Rahmen CTRP-vermittelter Effekte, insbesondere der

AMPK-Aktivierung, bekannt. Einerseits wiesen Zheng et al. erstmals mit Hilfe von Ko-Immunopräzipitationsversuchen eine Interaktion zwischen CTRP 9 und AdipoR1 nach [142]. Andererseits konnte ein siRNA-vermittelter *Knockdown* der Adiponektinrezeptoren die CTRP-induzierte AMPK-Aktivierung in einer Studie an Skelettmuskelzellen nicht verhindern [93]. Es ist bisher jedoch nicht gelungen, CTRP-spezifische Rezeptoren zu identifizieren. Auch posttranslationale Modifikationen der CTRPs könnten die Rezeptoraffinität und damit die Wirkung der CTRPs beeinflussen. Zudem sind sowohl Adiponektin, als auch die CTRPs in der Lage, sich als Homo- oder Heterotrimere zusammenzulagern, welche sich teilweise zu komplexeren Strukturen organisieren [100, 135]. Sowohl globuläres, als auch trimeres Adiponektin induzieren im Gegensatz zu HMW-Formen den Signalweg der AMP-aktivierten Protein Kinase [105, 123]. In Bezug auf methodische Einschränkungen gilt daher zu beachten, dass bakteriell hergestelltes Adiponektin, wie es in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde, nicht über posttranslationale Modifikationen verfügt und keine hochmolekularen Isoformen ausbildet.

#### **4.3 Protektive Effekte von Adiponektin und der CTRPs in Reaktion auf oxidativen Stress und die Rolle der AMP-aktivierten Proteinkinase**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung von oxidativen Stressoren auf die Vitalität isolierter Kardiomyozyten zu untersuchen und mögliche protektive Effekte durch Vorbehandlung mit Adiponektin oder den CTRPs 1, 2, 7 und 9 aufzuzeigen. I/R-Versuchsmodelle anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass Adiponektin vor Myokardschäden durch oxidativen Stress schützt, wobei sowohl von AMPK-abhängigen, als auch von AMPK-unabhängigen Mechanismen ausgegangen wird. So inhibiert Adiponektin einerseits AMPK-unabhängig die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und führt zu einer verminderten Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheit gp91phox im kardialen Gewebe [118, 132]. Andererseits werden durch das Adipozytokin ROS-induzierte kardiale *Remodelling*-Prozesse auch über AMPK-abhängige Mechanismen vermindert, wie von Essick et al. beschrieben werden konnte. Hierbei ließ sich in Versuchen an adulten ventrikulären Rattenkardiomyozyten eine AMPK-abhängige Hemmung von *extracellular-signal-regulated kinases* (ERK) sowie des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch Acrp30 nachweisen [25].



In der vorliegenden Arbeit erfolgte zunächst die Quantifizierung lebendiger, apoptotischer oder nekrotischer Zellen durch Anfärben mit den DNA-Farbstoffen Hoechst33258 und Propidiumiodid sowie mit Hilfe zellmorphologischer Kriterien. Als Vertreter der reaktiven Sauerstoffspezies wurde Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in Konzentrationen von 0,1 – 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Goto et al. [30] führte die Behandlung mit  $> 1\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  überwiegend zur Nekrose der untersuchten Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Adiponektin, als auch die Paraloge CTRP 1, 2, 7 und 9 die Kardiomyozyten vor  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierter Nekrose schützen. Diese Effekte scheinen AMPK-vermittelt, da mittels Hemmung der Proteinkinase durch den Inhibitor AraA 30 Minuten vor Stimulation die protektiven Wirkungen des Adipozytokins und der betrachteten Paraloge aufgehoben werden konnten.

Eine Vielzahl von Untersuchungen beschäftigt sich mit den protektiven Mechanismen und Signalwegen, über welche die AMPK in ischämischen Kardiomyozyten wirkt, wobei der Fokus der meisten Studien auf metabolischen und antiapoptotischen Funktionen des Enzyms liegt. So konnte in verschiedenen Zelltypen gezeigt werden, dass die AMPK die gesteigerte Translokation der Glukosetransporter (GLUT) 1 und 4 in die Zellmembran vermittelt [5, 98]. Ji et al. [55] beschreiben einen Zusammenhang zwischen der protektiven ischämischen Präkonditionierung (*ischemic preconditioning* = IPC) des Herzens und dem Einfluss der AMPK auf den zellulären Glukosehaushalt: Die Inhibition der AMPK-vermittelten GLUT-4-Translokation führte zu einer Reduktion der kardioprotektiven IPC-Wirkung in adulten Kardiomyozyten der Ratte. Daneben werden antiapoptotische AMPK-Effekte, wie Regulation von Proteinen der *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2)-Familie, Einfluss auf die Aktivität von Kaspasen sowie Hemmung der Freisetzung von Cytochrom-C beschrieben [59].

Die Rolle der AMPK in der Adiponektin- und CTRP-vermittelten Protektion gegen oxidativen Stress wird dagegen kontrovers diskutiert. So kann in Adiponektin-*knockout*-Mäusen nach Ischämie-Reperfusion mittels TUNEL-Färbung ein höherer Anteil apoptotischer Zellen nachgewiesen werden, während die Gabe von Acrp30 AMPK-vermittelt diesen Anstieg verhindert [107]. In einer weiteren Studie wiesen Mäuse mit einer Mutation der katalytischen AMPK $\alpha$ -Untereinheit einerseits sowohl einen größeren Anteil apoptotischer Zellen, eine Zunahme der Infarktgröße, als auch eine herabgesetzte

kardiale Funktion in I/R-Versuchen auf. Andererseits bewirkte die Gabe von globulärem Adiponektin (2 µg/g) auch in diesen Tieren ein geringeres Ausmaß an kardialen Schädigungen, was auf AMPK-unabhängige Signalwege deuten könnte [128]. Im Gegensatz dazu führte in der vorliegenden Arbeit die AraA-induzierte Hemmung der AMPK zu einer vollständig aufgehobenen Wirkung des Adipozytokins.

Konträr zu Adiponektin wurden die CTRPs – mit Ausnahme des CTRP 9 – bisher kaum hinsichtlich antioxidativer Funktionen im Herzen untersucht. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass neben CTRP 9 sowohl die Paraloge CTRP 1 und 7, als auch in geringerem Maße CTRP 2 isolierte Kardiomyozyten AMPK-vermittelt vor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter Nekrose bewahren. In einer Untersuchung an neonatalen Rattenkardiomyozyten konnten auch Kambara et al. zeigen, dass eine Stimulation mit CTRP 9 (10µg/ml) die isolierten Kardiomyozyten AMPK-abhängig vor Ischämie-Reperfusionsschäden schützt [56]. Nachgeschaltete Signaltransduktionswege, über welche Adiponektin und die CTRPs AMPK-vermittelt antioxidativ wirken, sind bislang jedoch kaum erforscht. Iwabu et al. zeigten im Skelettmuskel von AdipoR1-*knockout*-Mäusen einen Zusammenhang zwischen der Expression des Adiponektinrezeptors und der Proteinexpression der MnSOD sowie der Katalase [52]. Der Einfluss der in der vorliegenden Arbeit am stärksten antioxidativ wirksamen Adiponektinparaloge CTRP 7 und 9 auf das antioxidative Schutzsystem war daher Gegenstand weiterer Untersuchungen.

#### **4.4 Einfluss von CTRP 7 und 9 auf Aktivität und Regulation von Komponenten des antioxidativen Schutzsystems**

Adiponektin induziert enzymatische Komponenten des antioxidativen Schutzsystems, wie Superoxiddismutasen und Katalasen, in verschiedenen Zelltypen, unter anderem in murinen Skelettmuskel- [50] und Leberzellen [27], humanen Monozyten [6] sowie in humanen Prostatakarzinomzellen [71]. Im Gegensatz dazu existieren bislang keine Studien zum Einfluss der CTRPs auf die Expression antioxidativer Enzyme. Vorversuche der Arbeitsgruppe an H9c2-Kardiomyoblasten konnten jedoch aufzeigen, dass die Präinkubation mit CTRP 7 und 9 einen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten, intrazellulären ROS-Anstieg verhindert. Da H9c2-Zellen wesentlich unempfindlicher gegenüber einer Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sind, wurden in diesen Experimenten höhere Konzentrationen von

Wasserstoffperoxid eingesetzt. Während die Stimulation der Zellen mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären ROS führte, wurde dies durch Präinkubation sowohl mit CTRP 7, als auch mit CTRP 9 über 24 Stunden verhindert. Zudem war eine basale Abnahme der intrazellulären ROS nach alleiniger Gabe von CTRP 9 zu beobachten. Als möglicher zugrunde liegender Mechanismus führten beide CTRPs in dieser Arbeit zu einer signifikant gesteigerten mRNA-Expression der MnSOD, des Trx 1 sowie der GPX 2. Zudem induzierte CTRP 7 die Expression von Trx 2. Eine Beteiligung der AMPK an der gesteigerten Enzymexpression konnte mit Hilfe von Metformin sowie dem Inhibitor AraA für die MnSOD, Trx 1 sowie GPX 2 nachgewiesen werden.

Sind Zellen oxidativem Stress ausgesetzt, kommt es zu einer gesteigerten Transkription von Genen, die für eine Reihe antioxidativer Proteine und Enzyme kodieren. Eine wichtige Rolle nimmt hierbei die *Enhancer*-Region ARE ein [84]. Durch Bindung von Transkriptionsfaktoren an die ARE-Region kommt es zu einer verstärkten Expression einer Reihe von Zielgenen. Da die Expression der MnSOD sowie von Trx1 in der vorliegenden Arbeit durch Stimulation mit CTRP 7 und 9 am stärksten induziert wurde, erfolgte in weiteren Versuchen der Arbeitsgruppe die Untersuchung der *Promoter*-Aktivität durch Messung der Reportergenexpression mit Hilfe des Dual-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay Systems (Promega) in H9C2-Kardiomyoblasten. Diese Zellen eignen sich im Gegensatz zu isolierten Rattenkardiomyozyten besser für Langzeit- und Transfektionsversuche. Nach 24-stündiger Inkubation mit CTRP 7 oder CTRP 9 zeigte sich eine signifikant gesteigerte Aktivität sowohl des MnSOD-, als auch des Trx 1-*Promoters*, welche durch gezielte ARE-Mutation unterdrückt werden konnte.

Ein bedeutender Transkriptionsfaktor, welcher durch Interaktion mit ARE eine Vielzahl antioxidativer Gene, unter anderem für die Enzyme Häm-Oxygenase 1 (HO-1), GPX, SOD, Trx und Katalase, reguliert, ist der *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) [51, 60]. Eine aktuelle Untersuchung an H9C2-Kardiomyoblasten lässt vermuten, dass dem Nrf2-ARE-Signalweg eine besondere Bedeutung in der Aktivierung antioxidativer Mechanismen nach hypoxischer Präkonditionierung zukommt [44]. In einigen Studien konnte eine Verbindung zu AMPK-vermittelten Signalwegen gezeigt werden. So beschrieben Liu et al. eine AMPK-induzierte Steigerung der HO-1-Genexpression über den Nrf2-ARE-Signalweg in humanen Endothelzellen [70]. Mo et al. detektierten zudem eine AMPK-abhängige Nrf2-Induktion mit nachfolgend

gesteigerter HO-1-Expression in Makrophagen nach Stimulation mit dem AMPK-Aktivator Berberin [80]. Untersuchungen an humanen T-Zellen [53] zeigten, dass die Nrf2-ARE-Aktivierung durch das Polyphenol Resveratrol durch die AMPK $\alpha$ -Untereinheit vermittelt ist, welche die Nrf2-Kinase GSK3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ) phosphoryliert.

Basierend auf diesen Erkenntnissen lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten, dass CTRP 7 und 9, welche verstärkt im erkrankten Herzen gebildet werden (siehe Abschnitt 4.1.3) und isolierte Kardiomyozyten vor ROS-induzierter Nekrose schützen (siehe Abschnitt 4.3), über eine AMPK-ARE-Signalachse die Expression antioxidativer Enzyme induzieren. Weiterführende Untersuchungen sind nötig, um zwischengeschaltete Komponenten dieser kardioprotektiven Signalachse sowie deren Interaktion und Regulation näher zu beleuchten.

#### **4.5 Einfluss von Adiponektin und der CTRPs auf die kontraktile Funktion des Herzens**

Im Gegensatz zum kardioprotektiven Einfluss auf den Metabolismus oder das Gefäßsystem sind direkte Effekte von Adiponektin auf die kontraktile Funktion des Herzens bislang kaum erforscht. Erstmals wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zudem auch der Einfluss der Adiponektinparaloge CTRP 1, 2, 7 und 9 auf die kardiale Kontraktilität untersucht. Im Gegensatz zu den betrachteten CTRPs führte die Gabe von Adiponektin sowohl nach Kurz-, als auch nach Langzeitinkubation zu einer signifikant höheren Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit sowie einer gesteigerten prozentualen Verkürzung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen einer von Dong et al. veröffentlichten Studie, in der eine Behandlung mit 10 $\mu$ g/ml Adiponektin die herabgesetzte kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten diabetischer Mäuse verbesserte [23]. Gleichzeitig verhinderte die Gabe des Adipozytokins in *db/db*-Mäusen eine Verringerung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels, die bei unbehandelten *db/db*-Tieren beobachtet werden konnte. Iwabu et al. zeigten zudem in C2C12-Myozyten einen vermutlich AdipoR1-vermittelten, verstärkten Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen nach Stimulation mit 10 $\mu$ g/ml Acrp30 [52].

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zellverkürzungsversuche sind methodischen Limitationen unterworfen. Diese ergeben sich aus der Tatsache, dass die Analysen an isolierten, aus dem physiologischen Milieu entfernten Kardiomyozyten stattfanden. Die hier beschriebenen Untersuchungen lassen somit keine Aussage über das Kontraktionsverhalten unter Belastung zu, wie bei zunehmender Herzinsuffizienz zu erwarten wäre. In zukünftigen Experimenten sollte daher einerseits ein visköseres Medium eingesetzt und andererseits auch der Einfluss von Adiponektin auf den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in Kardiomyozyten untersucht werden.

Trotz der bestehenden Einschränkungen lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass Adiponektin im Gegensatz zu den CTRPs nicht nur auf vaskulärer, antioxidativer oder metabolischer Ebene, sondern auch direkt über Beeinflussung der Kontraktilität kardioprotektiv wirkt. Weiterführende Untersuchungen sollten sich daher mit den zugrunde liegenden Mechanismen sowie möglichen Interventionsmöglichkeiten dieser Acrp30-Wirkung befassen.

## 5 Zusammenfassung

Das kardioprotektive Adipozytokin Adiponektin wird als wichtiges Bindeglied zwischen Metabolismus, Immun- und Herz-Kreislaufsystem diskutiert. In den letzten Jahren wurde eine steigende Anzahl an strukturellen und funktionellen Paralogen beschrieben, die als *Clq/tumor necrosis factor- $\alpha$ -related proteins* bezeichnet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Expression der Adiponektinparaloge CTRP 1, 2, 7 und 9 im rechten Vorhof sowie im linken Ventrikel des Menschen gezeigt. Diese ist von Lebensalter, Ernährungsstatus und kardialen Erkrankungen abhängig. CTRP 7 und 9 sind verstärkt im RA älterer Übergewichtiger sowie im LV von Patienten mit nachgewiesener ICM oder DCM nachweisbar. Um vermutete kompensatorische Effekte der CTRPs aufzuzeigen, wurde nachfolgend der Einfluss auf die AMPK-Signalkaskade untersucht. Sowohl Acrp30, als auch die CTRPs führen in isolierten adulten Kardiomyozyten zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung der AMPK sowie der ACC und schützen diese Zellen zudem AMPK-vermittelt vor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter Nekrose. CTRP 7 und 9 verhindern in kardialen Zellen einen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bedingten Anstieg intrazellulärer ROS. Als möglicher zugrunde liegender Mechanismus konnte eine AMPK-vermittelte gesteigerte Transkription der antioxidativen Enzyme MnSOD, Trx 1 und 2 sowie GPX 2 gezeigt werden.

Auf funktionaler Ebene wurde der Einfluss von Adiponektion und der CTRPs 1, 2, 7 und 9 auf die kardiale Kontraktilität untersucht. Im Gegensatz zu den CTRPs kommt es durch Adiponektin sowohl nach Kurz-, als auch nach Langzeitinkubation zu einer signifikant höheren Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit sowie einer gesteigerten prozentualen Verkürzung isolierter Kardiomyozyten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

In der Zusammenschau lassen die Ergebnisse dieser Arbeit den Schluss zu, dass CTRP 7 und 9, welche im Gegensatz zu Adiponektin verstärkt im erkrankten Herzen exprimiert werden, ein lokales Adiponektin-Defizit ausgleichen. Die vorwiegend AMPK-vermittelte Aktivierung von Komponenten des antioxidativen Schutzsystems durch CTRPs stellt einen potentiellen Kompensationsmechanismus zur gesteigerten ROS-Produktion im belasteten Herzen dar.

## 6 Summary

The cardioprotective adipocytokine adiponectin is discussed as an important link between metabolism, the immune and the cardiovascular systems. During the last years, a growing number of structural and functional paralogs has been designated as C1q/tumor necrosis factor- $\alpha$ -related proteins.

In this study, the expression of the adiponectin paralogs CTRP 1, 2, 7 and 9 was shown in the human right atrium and left ventricle for the first time. The expression depends on age, nutritional status and cardiac pathologies. CTRP 7 and 9 are strongly detectable in the RA of older obese individuals as well as in the LV of patients with diagnosed ICM or DCM. To elucidate putative compensatory effects of the CTRPs, the influence on the AMPK-signaling axis was analyzed. Acrp30 as well as the CTRPs lead to a time-dependent phosphorylation of the AMPK and the ACC in isolated adult cardiomyocytes and protect these cells in an AMPK-dependent manner from hydrogen peroxide-induced necrosis. CTRP 7 and 9 prevent a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced increase of intracellular ROS. As a possible underlying mechanism, there is an increased transcription of the antioxidative enzymes MnSOD, Trx 1 and 2 and GPX 2.

On a functional level, the influence of adiponectin and CTRP 1, 2, 7 and 9 on cardiac contractility was analyzed. Contrary to the CTRPs, adiponectin leads to significantly higher contraction and relaxation velocities and an increased shortening of isolated cardiomyocytes after short- and long-term incubation compared to the untreated control.

In summary, the results of this thesis lead to the conclusion that CTRP 7 and 9, which show an increased expression in the damaged heart, might compensate for a local adiponectin deficiency. Thus, the predominantly AMPK-dependent activation of components of the antioxidative system by CTRPs might be a potential compensatory mechanism against the elevated ROS-production in the weakened heart.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl-Coenzym A-Carboxylase
Acrp30	<i>adipocyte complement-related protein of 30 kDA</i>
AdipoR	Adiponektinrezeptor
AICAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-1- $\beta$ -D-Ribofuranosid
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AMPKK	AMPK-Kinase
APS	Ammoniumpersulfat
APPL	<i>adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine-binding domain, and leucine zipper motif</i>
Aqua bidest	Aqua bidestillata
AraA	Adenine 9- $\beta$ -D-arabinofuranoside
ARE	<i>antioxidative response element</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAR	Bin-Amphiphysin-Rvs
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	<i>body mass index</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CaMKK	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinases</i>
CCT	modifiziertes Medium M199
CD40L	<i>cluster of differentiation 40 ligand</i>
cDNA	komplementäre DNA
CTRP	<i>CIq/tumor necrosis factor-<math>\alpha</math>-related protein</i>
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIO	<i>diet induced obese</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i> Lösung
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure



ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinases</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FFA	<i>free fatty acids</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
GPX	Glutathion-Peroxidase
GSK3 $\beta$	<i>glycogen synthase kinase 3<math>\beta</math></i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HFD	<i>high fat diet</i>
HI	Herzinsuffizienz
HMW	<i>high molecular weight</i>
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase
HO-1	Häm-Oxygenase 1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICM	ischämische Kardiomyopathie
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPC	<i>ischemic preconditioning</i>
I/R	Ischämie-Reperfusion
LB	Luria-Broth, Luria-Bertani-Medium
LKB	<i>liver kinase B1</i>
LMW	<i>low molecular weight</i>
LV	linker Ventrikel
MBL	<i>mannan-binding lectin</i>
MMW	<i>middle molecular weight</i>
MnSOD	Manganhaltige SOD
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>

ND	<i>normal diet</i>
NTC	<i>no template control</i>
ob/ob	<i>obese/obese</i>
pACC	phosphorylierte Form der ACC
pAMPK	phosphorylierte Form der AMPK
PAQRs	<i>progesterin and adiponutrient receptors</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PGC-1 $\alpha$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1<math>\alpha</math></i>
PI	Propidiumiodid
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PPAR $\gamma$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></i>
RA	rechtes Atrium
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	reverse Transkription
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOD	Superoxid-Dismutase
Taq	<i>thermus aquaticus</i>
TBS-T	<i>tris-buffered saline tween</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TNF $\alpha$	<i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
TRAIL	<i>tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Trx	Thioredoxin
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
Vit. C	Vitamin C
vs.	versus
X-Gal	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-<math>\beta</math>-D-galactopyranoside</i>

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungen

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der Struktur eines Adiponektinmoleküls (modifiziert nach [102]).	6
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung der Struktur und Vergleich von Adiponektin und CTRP 1, 2, 7 und 9 (modifiziert nach [100]).	9
<b>Abbildung 3:</b> Überblick über die biologischen Funktionen der CTRPs.	10
<b>Abbildung 4:</b> Interaktion von AdipoR mit nachgeschalteten Signalwegen (modifiziert nach [36, 128, 143]).	13
<b>Abbildung 5:</b> Vektorkarte pCR <sup>TM</sup> 4-TOPO <sup>®</sup> (modifiziert nach der Anleitung TOPO <sup>®</sup> TA Cloning <sup>®</sup> Kit for Sequencing, Invitrogen ).	33
<b>Abbildung 6:</b> Ermittlung der Zellvitalität mittels Hoechst33258 und PI.	37
<b>Abbildung 7:</b> Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Messung der kontraktilen Antwort isolierter Kardiomyozyten der Ratte.	39
<b>Abbildung 8:</b> Expressionsanalysen von CTRP 1 und 2 im RA normosomer und adipöser Individuen unterschiedlicher Altersgruppen mittels quantitativer PCR.	41
<b>Abbildung 9:</b> Expressionsanalysen von CTRP 7 und 9 im RA normosomer und adipöser Individuen unterschiedlicher Altersgruppen mittels quantitativer PCR.	42
<b>Abbildung 10:</b> Expressionsanalysen von CTRP 7 und 9 im LV von Spendern, Patienten mit ICM oder DCM.	43
<b>Abbildung 11:</b> Expressionsanalysen von CTRP 7 und 9 im LV von Spendern, Patienten mit ICM oder DCM.	44
<b>Abbildung 12:</b> Western-Blot-Nachweis der AMPK- und ACC-Phosphorylierung in Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit Adiponektin.	45
<b>Abbildung 13:</b> Western-Blot-Nachweis der AMPK- und ACC-Phosphorylierung in Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit CTRP 1.	46
<b>Abbildung 14:</b> Western-Blot-Nachweis der AMPK- und ACC-Phosphorylierung in Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit CTRP 2.	47
<b>Abbildung 15:</b> Western-Blot-Nachweis der AMPK- und ACC-Phosphorylierung in Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit CTRP 7.	47
<b>Abbildung 16:</b> Western-Blot-Nachweis der AMPK- und ACC-Phosphorylierung in Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit CTRP 9.	48

---

<b>Abbildung 17:</b> Nachweis nekrotischer, PI-positiver Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration .....	49
<b>Abbildung 18:</b> Nachweis vitaler, Hoechst33258 positiver sowie nekrotischer, PI-positiver Zellen mittels Hoechst-Assay.....	50
<b>Abbildung 19:</b> Repräsentative Durchlichtaufnahmen isolierter adulter Rattenkardiomyozyten. ....	51
<b>Abbildung 20:</b> Nachweis vitaler, Hoechst 33258 positiver sowie nekrotischer, PI-positiver Zellen mittels Hoechst-Assay nach Behandlung mit Adiponektin .....	52
<b>Abbildung 21:</b> Nachweis vitaler, Hoechst33258 positiver sowie nekrotischer, PI-positiver Zellen mittels Hoechst-Assay nach Behandlung mit Adiponektin [4 µg/ml] sowie H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in steigender Konzentration.....	53
<b>Abbildung 22:</b> Nachweis vitaler, Hoechst33258 positiver sowie nekrotischer, PI-positiver Zellen mittels Hoechst-Assay nach Behandlung mit CTRP 1 [4 µg/ml]. ....	53
<b>Abbildung 23:</b> Nachweis vitaler, Hoechst 33258 positiver sowie nekrotischer, PI-positiver Zellen mittels Hoechst-Assay nach Behandlung mit CTRP 2 [4 µg/ml]. ....	54
<b>Abbildung 24:</b> Nachweis vitaler, Hoechst 33258 positiver sowie nekrotischer, PI-positiver Zellen mittels Hoechst-Assay nach Behandlung mit CTRP 7 [4 µg/ml]. ....	55
<b>Abbildung 25:</b> Nachweis vitaler, Hoechst 33258 positiver sowie nekrotischer, PI-positiver Zellen mittels Hoechst-Assay nach Behandlung CTRP 9 [4 µg/ml]. ....	56
<b>Abbildung 26:</b> Änderung der mRNA-Expression der MnSOD, Katalase, Trx1, Trx2, GPX1 sowie GPX2 in Rattenkardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit AraA [0,5mM], Metformin [2mM], CTRP 7 oder CTRP 9 [4µg/ml]. ....	57
<b>Abbildung 27:</b> Änderung der mRNA-Expression der MnSOD (A), Katalase (B), Trx1 (C), Trx2 (D), GPX1 (E) sowie GPX2 (F) in Rattenkardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit AraA [0,5mM], Metformin [2mM], CTRP 7 oder CTRP 9 [4µg/ml]. ..	58
<b>Abbildung 28:</b> Einfluss von Adiponektin auf die Kontraktionsgeschwindigkeit [µm/s] isolierter Kardiomyozyten.....	59
<b>Abbildung 29:</b> Einfluss von Adiponektin auf die Relaxationsgeschwindigkeit [µm/s] isolierter Kardiomyozyten.....	60
<b>Abbildung 30:</b> Einfluss von Adiponektin auf die Zellverkürzung [%] isolierter Kardiomyozyten.....	60
<b>Abbildung 31:</b> Repräsentative Einzellzellmessungen.....	61

<b>Abbildung 32:</b> Einfluss von CTRP 9 auf Kontraktionsgeschwindigkeit, Relaxationsgeschwindigkeit und Zellverkürzung [%] isolierter Kardiomyozyten bei einer Inkubationszeit von 5 min. ....	61
<b>Abbildung 33:</b> Einfluss von CTRP 9 auf Kontraktionsgeschwindigkeit, Relaxationsgeschwindigkeit und Zellverkürzung [%] isolierter Kardiomyozyten bei einer Inkubationszeit von 24 h. ....	62

## 8.2 Tabellen

<b>Tabelle 1:</b> Vielfalt der Adipozytokine (aus [33]). ....	5
<b>Tabelle 2:</b> Herkunft und Eigenschaften der eingesetzten Antikörper .....	21
<b>Tabelle 3:</b> Eigenschaften der eingesetzten Primer .....	21
<b>Tabelle 4:</b> Zusammensetzung des Powell-Perfusionsmediums.....	22
<b>Tabelle 5:</b> Zusammensetzung der Western-Blot-Gele (Angaben zur Herstellung eines Gels) .....	25
<b>Tabelle 6:</b> Zusammensetzung des Laufpuffers.....	26
<b>Tabelle 7:</b> Zusammensetzung des Blotpuffers .....	27
<b>Tabelle 8:</b> Zusammensetzung von TBS-T .....	27
<b>Tabelle 9:</b> Zusammensetzung des RT-Mix .....	29
<b>Tabelle 10:</b> Zusammensetzung des PCR-Mastermix-Ansatzes.....	30
<b>Tabelle 11:</b> Zusammensetzung des Real-Time-PCR-Reaktionsansatzes .....	31
<b>Tabelle 12:</b> Komponenten der Klonierungsreaktion .....	32
<b>Tabelle 13:</b> Komponenten des Restriktionsansatzes .....	35

**9 Literaturverzeichnis**

1. Abu-Elheiga L, Almarza-Ortega DB, Baldini A, Wakil SJ (1997) Human acetyl-CoA carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms. *The Journal of biological chemistry* 272:10669-10677
2. Alberti KG, Zimmet PZ (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 15:539-553
3. Apovian CM, Bigornia S, Mott M, Meyers MR, Ulloor J, Gagua M, McDonnell M, Hess D, Joseph L, Gokce N (2008) Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28:1654-1659
4. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and biophysical research communications* 257:79-83
5. Barnes K, Ingram JC, Porras OH, Barros LF, Hudson ER, Fryer LG, Fougelle F, Carling D, Hardie DG, Baldwin SA (2002) Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *Journal of cell science* 115:2433-2442
6. Bauer S, Wanninger J, Neumeier M, Wurm S, Weigert J, Kopp A, Bala M, Schaffler A, Aslanidis C, Buechler C (2011) Elevated free fatty acids and impaired adiponectin bioactivity contribute to reduced SOD2 protein in monocytes of type 2 diabetes patients. *Experimental and molecular pathology* 90:101-106
7. Berg AH, Scherer PE (2005) Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation research* 96:939-949
8. Bianchi A, Evans JL, Iverson AJ, Nordlund AC, Watts TD, Witters LA (1990) Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. *The Journal of biological chemistry* 265:1502-1509

9. Bremer AA, Devaraj S, Afify A, Jialal I (2011) Adipose tissue dysregulation in patients with metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96:E1782-1788
10. Bremer AA, Jialal I (2013) Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome. *Journal of obesity* 2013:393192
11. Carlson CA, Kim KH (1973) Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 248:378-380
12. Caselli C, Lionetti V, Cabiati M, Prescimone T, Aquaro GD, Ottaviano V, Bernini F, Mattii L, Del Ry S, Giannessi D (2012) Regional evidence of modulation of cardiac adiponectin level in dilated cardiomyopathy: pilot study in a porcine animal model. *Cardiovascular diabetology* 11:143
13. Chalupova L, Zakovska A, Adamcova K (2013) Development of a novel enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of serum CTRP1: a pilot study: measurement of serum CTRP1 in healthy donors and patients with metabolic syndrome. *Clinical biochemistry* 46:73-78
14. Chan AY, Soltys CL, Young ME, Proud CG, Dyck JR (2004) Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte. *The Journal of biological chemistry* 279:32771-32779
15. Chandler HL, Colitz CM (2006) Molecular biology for the clinician: understanding current methods. *Journal of the American Animal Hospital Association* 42:326-335
16. Chelikani P, Fita I, Loewen PC (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61:192-208
17. Collins SP, Reoma JL, Gamm DM, Uhler MD (2000) LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo. *The Biochemical journal* 345 Pt 3:673-680
18. D'Autreaux B, Toledano MB (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology* 8:813-824

19. Davies SP, Sim AT, Hardie DG (1990) Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase. *European journal of biochemistry / FEBS* 187:183-190
20. de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, Wild S, Zheng SS, Beart PM, Hertzog PJ, Kola I (1998) Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *The Journal of biological chemistry* 273:22528-22536
21. Denzel MS, Scimia MC, Zumstein PM, Walsh K, Ruiz-Lozano P, Ranscht B (2010) T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *The Journal of clinical investigation* 120:4342-4352
22. Diamant M, Tushuizen ME (2006) The metabolic syndrome and endothelial dysfunction: common highway to type 2 diabetes and CVD. *Current diabetes reports* 6:279-286
23. Dong F, Ren J (2009) Adiponectin improves cardiomyocyte contractile function in db/db diabetic obese mice. *Obesity (Silver Spring, Md)* 17:262-268
24. Duus K, Pagh RT, Holmskov U, Hojrup P, Skov S, Houen G (2007) Interaction of calreticulin with CD40 ligand, TRAIL and Fas ligand. *Scandinavian journal of immunology* 66:501-507
25. Essick EE, Ouchi N, Wilson RM, Ohashi K, Ghobrial J, Shibata R, Pimentel DR, Sam F (2011) Adiponectin mediates cardioprotection in oxidative stress-induced cardiac myocyte remodeling. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 301:H984-993
26. Fridovich I (1978) The biology of oxygen radicals. *Science (New York, NY)* 201:875-880
27. Fukushima J, Kamada Y, Matsumoto H, Yoshida Y, Ezaki H, Takemura T, Saji Y, Igura T, Tsutsui S, Kihara S, Funahashi T, Shimomura I, Tamura S, Kiso S, Hayashi N (2009) Adiponectin prevents progression of steatohepatitis in mice by regulating oxidative stress and Kupffer cell phenotype polarization. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 39:724-738
28. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I (2004) Increased



- oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation* 114:1752-1761
29. Garitaonandia I, Smith JL, Kupchak BR, Lyons TJ (2009) Adiponectin identified as an agonist for PAQR3/RKTG using a yeast-based assay system. *Journal of receptor and signal transduction research* 29:67-73
30. Goto K, Takemura G, Maruyama R, Nakagawa M, Tsujimoto A, Kanamori H, Li L, Kawamura I, Kawaguchi T, Takeyama T, Fujiwara H, Minatoguchi S (2009) Unique mode of cell death in freshly isolated adult rat ventricular cardiomyocytes exposed to hydrogen peroxide. *Medical molecular morphology* 42:92-101
31. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH (2009) The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC public health* 9:88
32. Ha J, Daniel S, Broyles SS, Kim KH (1994) Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *The Journal of biological chemistry* 269:22162-22168
33. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL (2008) Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European heart journal* 29:2959-2971
34. Hardie DG, Carling D, Carlson M (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annual review of biochemistry* 67:821-855
35. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome research* 6:986-994
36. Heiker JT, Kosel D, Beck-Sickinger AG (2010) Molecular mechanisms of signal transduction via adiponectin and adiponectin receptors. *Biological chemistry* 391:1005-1018
37. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T (2001) Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104:2673-2678
38. Herman MA, Kahn BB (2006) Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *The Journal of clinical investigation* 116:1767-1775
39. Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L (2002) Peroxiredoxins. *Biological chemistry* 383:347-364

40. Holmgren A (1985) Thioredoxin. *Annual review of biochemistry* 54:237-271
41. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y (2000) Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20:1595-1599
42. Hou X, Song J, Li XN, Zhang L, Wang X, Chen L, Shen YH (2010) Metformin reduces intracellular reactive oxygen species levels by upregulating expression of the antioxidant thioredoxin via the AMPK-FOXO3 pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 396:199-205
43. Houstis N, Rosen ED, Lander ES (2006) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440:944-948
44. Huang XS, Chen HP, Yu HH, Yan YF, Liao ZP, Huang QR (2014) Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for hypoxic preconditioning-mediated delayed cardioprotection. *Molecular and cellular biochemistry* 385:33-41
45. Huang Z, Cui T, Liu J, Zhuang Y, Meng Q, Tao L, Li Z (2008) Characterization of the Expression of CTRP9, a Paralog of Adiponectin. *Tsinghua Science & Technology* 13:492-499
46. Hug C, Lodish HF (2005) The role of the adipocyte hormone adiponectin in cardiovascular disease. *Current opinion in pharmacology* 5:129-134
47. Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF (2004) T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:10308-10313
48. Hwang YC, Woo Oh S, Park SW, Park CY (2013) Association of serum C1q/TNF-Related Protein-9 (CTRP9) concentration with visceral adiposity and metabolic syndrome in humans. *International journal of obesity* (2005)
49. Ichihara S (2013) The pathological roles of environmental and redox stresses in cardiovascular diseases. *Environmental health and preventive medicine* 18:177-184

- 
50. Ikegami Y, Inukai K, Imai K, Sakamoto Y, Katagiri H, Kurihara S, Awata T, Katayama S (2009) Adiponectin upregulates ferritin heavy chain in skeletal muscle cells. *Diabetes* 58:61-70
  51. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, Bannai S, Yamamoto M (2000) Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 275:16023-16029
  52. Iwabuchi M, Yamauchi T, Okada-Iwabuchi M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, Ogata H, Kubota N, Takamoto I, Hayashi YK, Yamauchi N, Waki H, Fukayama M, Nishino I, Tokuyama K, Ueki K, Oike Y, Ishii S, Hirose K, Shimizu T, Touhara K, Kadowaki T (2010) Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature* 464:1313-1319
  53. Iwasaki K, Ray PD, Huang BW, Sakamoto K, Kobayashi T, Tsuji Y (2013) Role of AMP-activated protein kinase in ferritin H gene expression by resveratrol in human T cells. *Biochemistry* 52:5075-5083
  54. Jeon JH, Kim KY, Kim JH, Baek A, Cho H, Lee YH, Kim JW, Kim D, Han SH, Lim JS, Kim KI, Yoon do Y, Kim SH, Oh GT, Kim E, Yang Y (2008) A novel adipokine CTRP1 stimulates aldosterone production. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22:1502-1511
  55. Ji L, Zhang X, Liu W, Huang Q, Yang W, Fu F, Ma H, Su H, Wang H, Wang J, Zhang H, Gao F (2013) AMPK-regulated and Akt-dependent enhancement of glucose uptake is essential in ischemic preconditioning-alleviated reperfusion injury. *PloS one* 8:e69910
  56. Kambara T, Ohashi K, Shibata R, Ogura Y, Maruyama S, Enomoto T, Uemura Y, Shimizu Y, Yuasa D, Matsuo K, Miyabe M, Kataoka Y, Murohara T, Ouchi N (2012) CTRP9 protein protects against myocardial injury following ischemia-reperfusion through AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 287:18965-18973
  57. Kemp CD, Conte JV (2012) The pathophysiology of heart failure. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 21:365-371

58. Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89:2548-2556
59. Kewalramani G, Puthanveetil P, Wang F, Kim MS, Deppe S, Abrahani A, Luciani DS, Johnson JD, Rodrigues B (2009) AMP-activated protein kinase confers protection against TNF- $\alpha$ -induced cardiac cell death. *Cardiovascular research* 84:42-53
60. Kim YC, Masutani H, Yamaguchi Y, Itoh K, Yamamoto M, Yodoi J (2001) Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors. *The Journal of biological chemistry* 276:18399-18406
61. Kishore U, Gaboriaud C, Waters P, Shrive AK, Greenhough TJ, Reid KB, Sim RB, Arlaud GJ (2004) C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trends in immunology* 25:551-561
62. Kobayashi H, Matsuda M, Fukuhara A, Komuro R, Shimomura I (2009) Dysregulated glutathione metabolism links to impaired insulin action in adipocytes. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 296:E1326-1334
63. Kosel D, Heiker JT, Juhl C, Wottawah CM, Bluher M, Morl K, Beck-Sickinger AG (2010) Dimerization of adiponectin receptor 1 is inhibited by adiponectin. *Journal of cell science* 123:1320-1328
64. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y (2003) Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23:85-89
65. Lasser G, Guchhait P, Ellsworth JL, Sheppard P, Lewis K, Bishop P, Cruz MA, Lopez JA, Fruebis J (2006) C1qTNF-related protein-1 (CTRP-1): a vascular wall protein that inhibits collagen-induced platelet aggregation by blocking VWF binding to collagen. *Blood* 107:423-430
66. Laughlin GA, Barrett-Connor E, May S, Langenberg C (2007) Association of adiponectin with coronary heart disease and mortality: the Rancho Bernardo study. *American journal of epidemiology* 165:164-174

67. Li L, Wu L, Wang C, Liu L, Zhao Y (2007) Adiponectin modulates carnitine palmitoyltransferase-1 through AMPK signaling cascade in rat cardiomyocytes. *Regulatory peptides* 139:72-79
68. Liao Y, Takashima S, Maeda N, Ouchi N, Komamura K, Shimomura I, Hori M, Matsuzawa Y, Funahashi T, Kitakaze M (2005) Exacerbation of heart failure in adiponectin-deficient mice due to impaired regulation of AMPK and glucose metabolism. *Cardiovascular research* 67:705-713
69. Liberopoulos EN, Elisaf MS (2005) Diagnosis of the metabolic syndrome: which definition should we use? *Hellenic journal of cardiology : HJC = Hellenike kardiologike epitheorese* 46:258-262
70. Liu XM, Peyton KJ, Shebib AR, Wang H, Korthuis RJ, Durante W (2011) Activation of AMPK stimulates heme oxygenase-1 gene expression and human endothelial cell survival. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 300:H84-93
71. Lu JP, Hou ZF, Duivenvoorden WC, Whelan K, Honig A, Pinthus JH (2012) Adiponectin inhibits oxidative stress in human prostate carcinoma cells. *Prostate cancer and prostatic diseases* 15:28-35
72. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS (2005) Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25:29-38
73. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Mizuno K, Matsuzawa Y, Matsubara K (1997) Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene* 190:227-235
74. Mao X, Kikani CK, Riojas RA, Langlais P, Wang L, Ramos FJ, Fang Q, Christ-Roberts CY, Hong JY, Kim RY, Liu F, Dong LQ (2006) APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nature cell biology* 8:516-523
75. Martin RM, Leonhardt H, Cardoso MC (2005) DNA labeling in living cells. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 67:45-52
76. McCord JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine* 108:652-659

77. McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry* 244:6049-6055
78. McGreal E, Gasque P (2002) Structure-function studies of the receptors for complement C1q. *Biochemical Society transactions* 30:1010-1014
79. Miranda-Vizuete A, Ljung J, Damdimopoulos AE, Gustafsson JA, Oko R, Pelto-Huikko M, Spyrou G (2001) Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *The Journal of biological chemistry* 276:31567-31574
80. Mo C, Wang L, Zhang J, Numazawa S, Tang H, Tang X, Han X, Li J, Yang M, Wang Z, Wei D, Xiao H (2014) The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice. *Antioxidants & redox signaling* 20:574-588
81. Munday MR, Campbell DG, Carling D, Hardie DG (1988) Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *European journal of biochemistry / FEBS* 175:331-338
82. Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, Zhou G, Williamson JM, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, Goodyear LJ (2002) Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2074-2081
83. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M (1996) Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *Journal of biochemistry* 120:803-812
84. Nerland DE (2007) The antioxidant/electrophile response element motif. *Drug metabolism reviews* 39:235-248
85. Nicholls P (2012) Classical catalase: ancient and modern. *Archives of biochemistry and biophysics* 525:95-101
86. Niemann B, Pan R, Teschner M, Boening A, Silber RE, Rohrbach S (2013) Age and obesity-associated changes in the expression and activation of components of the AMPK signaling pathway in human right atrial tissue. *Experimental gerontology* 48:55-63

87. Ohashi K, Kihara S, Ouchi N, Kumada M, Fujita K, Hiuge A, Hibuse T, Ryo M, Nishizawa H, Maeda N, Maeda K, Shibata R, Walsh K, Funahashi T, Shimomura I (2006) Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension. *Hypertension* 47:1108-1116
88. Okuno Y, Matsuda M, Kobayashi H, Morita K, Suzuki E, Fukuhara A, Komuro R, Shimabukuro M, Shimomura I (2008) Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPARgamma-responsive region. *Biochemical and biophysical research communications* 366:698-704
89. Okuno Y, Matsuda M, Miyata Y, Fukuhara A, Komuro R, Shimabukuro M, Shimomura I (2010) Human catalase gene is regulated by peroxisome proliferator activated receptor-gamma through a response element distinct from that of mouse. *Endocrine journal* 57:303-309
90. Organisation WH (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organization technical report series 894:i-xii, 1-253
91. Otani M, Kogo M, Furukawa S, Wakisaka S, Maeda T (2012) The adiponectin paralog C1q/TNF-related protein 3 (CTRP3) stimulates testosterone production through the cAMP/PKA signaling pathway. *Cytokine* 58:238-244
92. Palanivel R, Fang X, Park M, Eguchi M, Pallan S, De Girolamo S, Liu Y, Wang Y, Xu A, Sweeney G (2007) Globular and full-length forms of adiponectin mediate specific changes in glucose and fatty acid uptake and metabolism in cardiomyocytes. *Cardiovascular research* 75:148-157
93. Park SY, Choi JH, Ryu HS, Pak YK, Park KS, Lee HK, Lee W (2009) C1q tumor necrosis factor alpha-related protein isoform 5 is increased in mitochondrial DNA-depleted myocytes and activates AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 284:27780-27789
94. Peterson JM, Aja S, Wei Z, Wong GW (2012) CTRP1 protein enhances fatty acid oxidation via AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and acetyl-CoA carboxylase (ACC) inhibition. *The Journal of biological chemistry* 287:1576-1587
95. Peterson JM, Wei Z, Seldin MM, Byerly MS, Aja S, Wong GW (2013) CTRP9 transgenic mice are protected from diet-induced obesity and metabolic

- dysfunction. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology 305:R522-533
96. Pineiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, Dieguez C, Gualillo O, Gonzalez-Juanatey JR, Lago F (2005) Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. FEBS letters 579:5163-5169
  97. Piper HM, Millar BC, McDermott BJ (1989) The negative inotropic effect of neuropeptide Y on the ventricular cardiomyocyte. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology 340:333-337
  98. Russell RR, 3rd, Bergeron R, Shulman GI, Young LH (1999) Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. The American journal of physiology 277:H643-649
  99. Schafer K, Konstantinides SV (2011) Update on the cardiovascular risk in obesity: endocrine and paracrine role of the adipose tissue. Hellenic journal of cardiology : HJC = Hellenike kardiologike epitheorese 52:327-336
  100. Schaffler A, Buechler C (2012) CTRP family: linking immunity to metabolism. Trends in endocrinology and metabolism: TEM 23:194-204
  101. Scherer PE (2006) Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. Diabetes 55:1537-1545
  102. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF (1995) A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. The Journal of biological chemistry 270:26746-26749
  103. Schluter KD, Schreiber D (2005) Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture. Methods in molecular biology (Clifton, NJ) 290:305-314
  104. Schmeißer S RM, Birringer M (2013) Recent reassessment of the role of reactive oxygen species (ROS). Ernährungs Umschau international:162-167
  105. Schraw T, Wang ZV, Halberg N, Hawkins M, Scherer PE (2008) Plasma adiponectin complexes have distinct biochemical characteristics. Endocrinology 149:2270-2282
  106. Shehzad A, Iqbal W, Shehzad O, Lee YS (2012) Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. Hormones (Athens, Greece) 11:8-20
  107. Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, Funahashi T, Ouchi N, Walsh K (2005) Adiponectin protects against myocardial ischemia-



- reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nature medicine* 11:1096-1103
108. Skurk C, Wittchen F, Suckau L, Witt H, Noutsias M, Fechner H, Schultheiss HP, Poller W (2008) Description of a local cardiac adiponectin system and its deregulation in dilated cardiomyopathy. *European heart journal* 29:1168-1180
109. Smith JL, Kupchak BR, Garitaonandia I, Hoang LK, Maina AS, Regalla LM, Lyons TJ (2008) Heterologous expression of human mPRalpha, mPRbeta and mPRgamma in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. *Steroids* 73:1160-1173
110. Song Y, Shi J, Wu Y, Han C, Zou J, Shi Y, Liu Z (2014) Metformin ameliorates insulin resistance in L6 rat skeletal muscle cells through upregulation of SIRT3. *Chinese medical journal* 127:1523-1529
111. Spiegelman BM, Flier JS (2001) Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531-543
112. Spyrou G, Enmark E, Miranda-Vizuete A, Gustafsson J (1997) Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *The Journal of biological chemistry* 272:2936-2941
113. Su H, Yuan Y, Wang XM, Lau WB, Wang Y, Wang X, Gao E, Koch WJ, Ma XL (2013) Inhibition of CTRP9, a novel and cardiac-abundantly expressed cell survival molecule, by TNFalpha-initiated oxidative signaling contributes to exacerbated cardiac injury in diabetic mice. *Basic research in cardiology* 108:315
114. Sun Y, Yi W, Yuan Y, Lau WB, Yi D, Wang X, Wang Y, Su H, Wang X, Gao E, Koch WJ, Ma XL (2013) C1q/tumor necrosis factor-related protein-9, a novel adipocyte-derived cytokine, attenuates adverse remodeling in the ischemic mouse heart via protein kinase A activation. *Circulation* 128:S113-120
115. Takemura Y, Ouchi N, Shibata R, Aprahamian T, Kirber MT, Summer RS, Kihara S, Walsh K (2007) Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies. *The Journal of clinical investigation* 117:375-386
116. Tang YT, Hu T, Arterburn M, Boyle B, Bright JM, Emtage PC, Funk WD (2005) PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *Journal of molecular evolution* 61:372-380

117. Taniguchi Y, Taniguchi-Ueda Y, Mori K, Yodoi J (1996) A novel promoter sequence is involved in the oxidative stress-induced expression of the adult T-cell leukemia-derived factor (ADF)/human thioredoxin (Trx) gene. *Nucleic acids research* 24:2746-2752
118. Tao L, Gao E, Jiao X, Yuan Y, Li S, Christopher TA, Lopez BL, Koch W, Chan L, Goldstein BJ, Ma XL (2007) Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Circulation* 115:1408-1416
119. Thampy KG (1989) Formation of malonyl coenzyme A in rat heart. Identification and purification of an isozyme of A carboxylase from rat heart. *The Journal of biological chemistry* 264:17631-17634
120. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350-4354
121. Truong Do M, Gyun Kim H, Ho Choi J, Gwang Jeong H (2014) Metformin induces microRNA-34a to downregulate the Sirt1/Pgc-1alpha/Nrf2 pathway, leading to increased susceptibility of wild-type p53 cancer cells to oxidative stress and therapeutic agents. *Free radical biology & medicine* 74c:21-34
122. Tsao TS, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF (2002) Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *The Journal of biological chemistry* 277:29359-29362
123. Tsao TS, Tomas E, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Ruderman NB, Heuser JE, Lodish HF (2003) Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *The Journal of biological chemistry* 278:50810-50817
124. Turer AT, Scherer PE (2012) Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia* 55:2319-2326
125. Uemura Y, Shibata R, Ohashi K, Enomoto T, Kambara T, Yamamoto T, Ogura Y, Yuasa D, Joki Y, Matsuo K, Miyabe M, Kataoka Y, Murohara T, Ouchi N (2013) Adipose-derived factor CTRP9 attenuates vascular smooth muscle cell

- proliferation and neointimal formation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27:25-33
126. Vlahos CJ, McDowell SA, Clerk A (2003) Kinases as therapeutic targets for heart failure. *Nature reviews Drug discovery* 2:99-113
  127. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T (2003) Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *The Journal of biological chemistry* 278:40352-40363
  128. Wang C, Xin X, Xiang R, Ramos FJ, Liu M, Lee HJ, Chen H, Mao X, Kikani CK, Liu F, Dong LQ (2009) Yin-Yang regulation of adiponectin signaling by APPL isoforms in muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 284:31608-31615
  129. Wang L, Wang X, Li Z, Xia T, Zhu L, Liu B, Zhang Y, Xiao F, Pan Y, Liu Y, Guo F, Chen Y (2013) PAQR3 has modulatory roles in obesity, energy metabolism, and leptin signaling. *Endocrinology* 154:4525-4535
  130. Wang X, Li X, Fan F, Jiao S, Wang L, Zhu L, Pan Y, Wu G, Ling ZQ, Fang J, Chen Y (2012) PAQR3 plays a suppressive role in the tumorigenesis of colorectal cancers. *Carcinogenesis* 33:2228-2235
  131. Wang X, Wang L, Zhu L, Pan Y, Xiao F, Liu W, Wang Z, Guo F, Liu Y, Thomas WG, Chen Y (2013) PAQR3 modulates insulin signaling by shunting phosphoinositide 3-kinase p110alpha to the Golgi apparatus. *Diabetes* 62:444-456
  132. Wang Y, Gao E, Tao L, Lau WB, Yuan Y, Goldstein BJ, Lopez BL, Christopher TA, Tian R, Koch W, Ma XL (2009) AMP-activated protein kinase deficiency enhances myocardial ischemia/reperfusion injury but has minimal effect on the antioxidant/antinitrative protection of adiponectin. *Circulation* 119:835-844
  133. Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H (2004) Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 323:630-635
  134. Wong GW, Krawczyk SA, Kitidis-Mitrokostas C, Ge G, Spooner E, Hug C, Gimeno R, Lodish HF (2009) Identification and characterization of CTRP9, a novel secreted glycoprotein, from adipose tissue that reduces serum glucose in mice and forms heterotrimers with adiponectin. *FASEB journal : official*

- publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 23:241-258
135. Wong GW, Krawczyk SA, Kitidis-Mitrokostas C, Revett T, Gimeno R, Lodish HF (2008) Molecular, biochemical and functional characterizations of C1q/TNF family members: adipose-tissue-selective expression patterns, regulation by PPAR-gamma agonist, cysteine-mediated oligomerizations, combinatorial associations and metabolic functions. *The Biochemical journal* 416:161-177
  136. Wong GW, Wang J, Hug C, Tsao TS, Lodish HF (2004) A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:10302-10307
  137. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-769
  138. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature medicine* 8:1288-1295
  139. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM (2001) Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86:3815-3819
  140. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
  141. Zhang Y, Wang XL, Zhao J, Wang YJ, Lau WB, Yuan YX, Gao EH, Koch WJ, Ma XL (2013) Adiponectin inhibits oxidative/nitrative stress during myocardial ischemia and reperfusion via PKA signaling. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 305:E1436-1443

142. Zheng Q, Yuan Y, Yi W, Lau WB, Wang Y, Wang X, Sun Y, Lopez BL, Christopher TA, Peterson JM, Wong GW, Yu S, Yi D, Ma XL (2011) C1q/TNF-related proteins, a family of novel adipokines, induce vascular relaxation through the adiponectin receptor-1/AMPK/eNOS/nitric oxide signaling pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31:2616-2623
143. Zhou L, Deepa SS, Etzler JC, Ryu J, Mao X, Fang Q, Liu DD, Torres JM, Jia W, Lechleiter JD, Liu F, Dong LQ (2009) Adiponectin activates AMP-activated protein kinase in muscle cells via APPL1/LKB1-dependent and phospholipase C/Ca<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry* 284:22426-22435

## 10 Publikationsverzeichnis

### 10.1 Publikationen

**Siegler BH**, Bernhard M, Brenner T, Gerlach H, Henrich M, Hofer S, John S, Kilger E, Krüger WA, Lichtenstern C, Mayer K, Müller M, Niemann B, Oppert M, Rex S, Rossaint R, Weiterer S, Weigand MA (2015). Central venous pressure - a safety parameter. *Anaesthesist* 64:977-980

**Siegler BH**, Bernhard M, Brenner T, Gerlach H, Henrich M, Hofer S, Kilger E, Krüger WA, Lichtenstern C, Mayer K, Müller M, Niemann B, Oppert M, Rex S, Rossaint R, Weiterer S, Weigand MA (2015). CVP - farewell? Please don't! : Comments on the S3 guidelines on "intravascular volume therapy in adults". *Anaesthesist* 64:489-93

Kojic D\*, **Siegler BH**\*, Uhle F, Lichtenstern C, Nawroth PP, Weigand MA, Hofer S, Brenner T (2015). From bench to bedside - are there new approaches for the diagnosis, therapy guidance and outcome prediction of sepsis? *World Journal of Experimental Medicine*. 20;5(2):50-63. *\*equal contribution*

Decker SO, Wortmann M, **Siegler BH**, Ulrich A, Hofer S, Brenner T (2015). Metformin-induced lactic acidosis: Severe symptoms with difficult diagnostics. *Anaesthesist*. 64(4):292-297.

Weiterer S, Uhle F, **Siegler BH**, Lichtenstern C, Bartkuhn M, Weigand MA (2015). Epigenetic regulation in sepsis: Current state of knowledge. *Anaesthesist*. 64(1):42-55.

Weiterer S, Uhle F, Lichtenstern C, **Siegler BH**, Bhuju S, Jarek M, Bartkuhn M, Weigand MA (2015). Sepsis induces specific changes in histone modification patterns in human monocytes. *PLOS ONE* 10(3):e0121748.

**Siegler BH**, Weiterer S, Lichtenstern C, Stumpp D, Brenner T, Hofer S, Weigand MA, Uhle F (2014). Use of biomarkers in sepsis: Update and perspectives. *Anaesthesist* 63:678-690

**Siegler BH**, Rex S, Weigand MA (2015). Die Messung des ZVD bei septischem Schock ist überflüssig! *Contra. Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung*

Li L, Stumpp D, **Siegler BH**, Micoogullari M, Niemann B, Aslam M, Bugger H, Hanna J, Schlüter KD, Silber RE, Rohrbach S. The adiponectin paralog CTRP9 but not CTRP7 mediates anti-oxidative and anti-hypertrophic effects in adult rat cardiomyocytes through an AMPK, adiponectin receptor and calreticulin dependent mechanism. [eingereicht]

## 10.2 Kongressbeiträge

Li L, Hanna J, **Siegler BH**, Niemann B, Rohrbach S (2013). Characterization of expressional patterns and signaling pathways activated by CTRP's in cardiac tissue. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim

Li L, **Siegler BH**, Stumpp D, Hanna J, Niemann B, Rohrbach S (2013). Protective effects of selected adiponectin paralogs in cardiomyocytes. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Heidelberg

**Siegler BH**, Li L, Pan R, Hanna J, Stumpp D, Niemann B, Rohrbach S (2012). Protective effects of adiponectin and the adiponectin paralogs CTRP 1-10 in the heart. Workshop on Cardiac Physiology and Experimental Cardiology, Giessen

Li L, **Siegler BH**, Aslam M, Pan R, Niemann B, Rohrbach S (2012). Effects of the adiponectin paralogs 7 and 9 on glucose metabolism. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Dresden

**Siegler BH**, Li L, Pan R, Niemann B, Rohrbach S (2012). Protective effects of adiponectin and the paralogs CTRP 1-10 in the heart. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Dresden

Li L, **Siegler BH**, Pan R, Niemann B, Rohrbach S (2011). Metabolic effects of the adiponectin paralogs 1-10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim

Li L, **Siegler BH**, Pan R, Rohrbach S (2010): Metabolic effects of the adiponectin paralogs 1-10. Workshop on Cardiac Physiology and Experimental Cardiology, Giessen

## **11 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

---

Ort, Datum

---

Benedikt Siegler



## 12 Danksagung

An erster Stelle danke ich ganz herzlich Frau Prof. Rohrbach für die Überlassung des Themas, die sehr gute Betreuung im Rahmen dieser Arbeit und die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf mehreren Kongressen präsentieren zu können.

Besonderen Dank richte ich an Frau Dr. Ling Li, Frau Dr. Ruping Pan und Frau Dr. Manuela Grötzner für die Einarbeitung in die Laborarbeit, den konstruktiven Austausch und den motivierenden Zuspruch.

Für die Möglichkeit, die Apparaturen zur Messung der kontraktilen Antwort nutzen zu können, möchte ich mich bei Herrn Prof. Schlüter ganz besonders bedanken. In diesem Zusammenhang ein herzliches Dankeschön auch an Herrn Dr. Rolf Schreckenbergs und Frau Daniela Schreiber für die Einführung in die Kardiomyozytenpräparation und die gemeinsame Zeit (teilweise spät in der Nacht) während der Einarbeitung in den „Zappelzirkus“!

Weiteren Dank schulde ich Herrn Dr. Muhammad Aslam für die interessanten Diskussionen und den Exkurs in die Immunhistochemie, auch wenn die dabei gewonnenen Erkenntnisse zur Translokation der Glukosetransporter letztlich nicht Teil dieser Doktorarbeit geworden sind.

Allen Doktorand(inn)en der Arbeitsgruppe danke ich für die gemeinsame Zeit und die gegenseitige Unterstützung! Für das Gelingen Eurer Arbeiten wünsche ich Euch alles Gute!

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und insbesondere Dorothee für die geduldige Unterstützung und den Rückhalt insbesondere während der gesamten Zeit des Studiums und darüber hinaus.

**13 Tabellarischer Lebenslauf**

*Der Lebenslauf wurde aus der  
veröffentlichten Version entfernt.*